

Die Proteine HA und M2 von Influenzaviren:
Bedeutung ihrer Acylierungen sowie der amphiphilen Helix
von M2 für die Virusassemblierung und -knospung

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Stefanie Siche

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann
2. PD Dr. Michael Veit
3. PD Dr. Thorsten Wolff

eingereicht: 15.12.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2016

ZUSAMMENFASSUNG

Influenzaviren sind von einer Membran umgeben, in der die Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase sowie das Protonenkanalprotein M2 eingebettet sind. Die Assemblierung neuer Viruspartikel erfolgt an cholesterol- und sphingolipidreichen Regionen, sogenannten „Membran-Rafts“, der apikalen Plasmamembran der Wirtszelle. HA besitzt zwei Raft-Lokalisationssignale: (1) kovalent gebundene Fettsäuren im Carboxy-Terminus (Acylierungen) sowie (2) hydrophobe Aminosäuren im nach außen gerichteten Bereich der Transmembrandomäne (TMD). HA definiert die Knospungszone, indem es stabile Raft-Domänen bildet, die als Plattform für die Assemblierung der viralen Komponenten dienen. M2 besitzt eine cytoplasmatische amphiphile Helix, in der ebenso eine Acylierung und außerdem Cholesterol-Bindemotive (CRAC, *cholesterol recognition/interaction amino acid consensus*) existieren. Es wurde postuliert, dass diese Signale der Raft-Assoziation dienen, die relativ kurze TMD das M2 jedoch am Rand der Knospungszone positioniert, wo seine amphiphile Helix die Virusabschnürung von der Wirtszelle vermittelt.

M2 wird aufgrund bisher nicht identifizierter intrinsischer Signale zur apikalen Plasmamembran transportiert. Ein Modell für den apikalen Transport schlägt einen Mechanismus vor, der darauf basiert, dass Proteine in Raft-Domänen inkorporiert werden und Raft-ähnliche Vesikel zur apikalen Plasmamembran transportiert werden. In dieser Arbeit wurde per Konfokalmikroskopie an polarisierten Zellen, die fluoreszenzmarkierte M2-Varianten exprimierten, gezeigt, dass die potenziellen Raft-Lokalisationssignale von M2 aber nicht für den apikalen Transport benötigt werden. Des Weiteren ergaben Messungen des Förster-Resonanzenergietransfers über Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie (FLIM-FRET) in der Plasmamembran lebender Zellen, die fluoreszenzmarkiertes HA und M2 koexprimierten, dass diese Motive auch nicht für die Interaktion mit HA bzw. mit den durch HA stabilisierten Raft-Domänen notwendig sind. Dagegen führte die Deletion der Raft-Lokalisationssignale im HA zu einem deutlich reduzierten Clustern mit M2.

Außerdem wurde die Bedeutung der HA-Acylierungen im viralen Kontext untersucht. Mittels reverser Genetik konnten keine infektiösen WSN-Viren ohne die zwei cytoplasmatischen Acylierungen hergestellt werden. Das Wachstum von Viren mit fehlender Acylierung am Ende der HA-TMD (HA Ac1) war hingegen nur um eine Titerstufe gegenüber Wildtypviren reduziert. Um der Frage nach einer möglichen Synergie zwischen den Acylierungen von HA

und M2 nachzugehen, wurden rekombinante Viren mit unteracyliertem HA (HA Ac1) und nicht-acyliertem M2 (M2 C50S) hergestellt. Während Viren, die nur nicht-acyliertes M2 besitzen, wie der Wildtyp wachsen, war das Wachstum der Doppelacylierungsmutante im Vergleich zu HA Ac1-Viren um eine und im Vergleich zum Wildtyp um zwei Titerstufen reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die Acylierungen von HA und M2 für den gleichen Schritt des viralen Replikationszyklus von Bedeutung sind. Die Morphologie und Proteinzusammensetzung der Viruspartikel war weder in den Einzelmutanten noch in der Doppelmutante signifikant verschieden vom Wildtyp.

Der dritte Schwerpunkt dieser Arbeit war die amphiphile M2-Helix. Es wurde postuliert, dass sie die Membrankrümmung detektieren kann, M2 am Hals der knospenden Viren lokalisiert und durch Insertion in die Wirtszellmembran die Virusabschnürung bewirkt. Infektiöse WSN-Viren ohne M2 oder ohne dessen cytoplasmatische Helix konnten ebenso wie Viren mit M2 mit einer Helix mit reduzierter Amphiphilität in dieser Arbeit nicht hergestellt werden. Allerdings führte die Substitution der Helix durch typische krümmungsdetektierende der -modulierende Helices zu Viren, deren Wachstum um zwei bis vier Titerstufen im Vergleich zum Wildtyp reduziert war. Die Helix-Amphiphilität scheint wichtig zu sein, aber auch die Sequenz oder bestimmte Aminosäuren sind offenbar für eine effiziente Virusreplikation notwendig.

SUMMARY

Influenza virus particles are enveloped by a membrane in which the glycoproteins haemagglutinin (HA) and neuraminidase as well as the proton channel protein M2 are embedded. The assembly of progeny viral particles occurs at the apical plasma membrane of the host cell at cholesterol- and sphingolipid-rich domains, the so-called “membrane rafts”. HA possesses two raft-targeting signals: (1) fatty acids covalently attached to the Carboxy-terminal region and (2) hydrophobic amino acids in the outer part of the transmembrane domain (TMD). HA defines the viral “budozone” by generating stabilised raft domains, which serve as a platform for the assembly of the viral components. M2 possesses a cytoplasmic amphiphilic helix (AH) which contains an acylation and in addition cholesterol-binding motifs (CRAC, *cholesterol recognition/interaction amino acid consensus*). It has been postulated that these signals serve for raft-association, but that the relatively short TMD of M2 directs the protein to the edge of the budozone, where its AH mediates membrane scission and release of the budding virion.

M2 is transported to the apical plasma membrane but the responsible signals have not been identified yet. One model has been proposed suggesting an apical targeting mechanism based on protein incorporation into raft domains and apical sorting of raft-like vesicles. However, in this work, confocal microscopy of polarised cells expressing fluorescently labelled M2-variants demonstrated that the putative raft-targeting signals of M2 are not required for apical transport. Furthermore, FLIM-FRET (Förster resonance energy transfer measured *via* fluorescence lifetime imaging microscopy) analyses, performed in the plasma membrane of living cells coexpressing fluorescently labelled HA and M2, revealed that these M2-motifs are not required for association with the large coalesced raft phase organised by HA. In contrast, deleting HA’s raft-targeting features clearly reduced clustering with M2.

In addition, the significance of HA’s acylations for growth of recombinant WSN viruses was investigated. While the deletion of the two cytoplasmic acylations prevented the rescue of infectious virus by reverse genetics, the growth of a mutant virus without acylation in the HA-TMD (HA Ac1) was reduced by only one order of magnitude as compared to the wildtype. To address whether there is a possible synergy between the acylations of HA and M2, recombinant viruses with underacylated HA (HA Ac1) and non-acylated M2 (M2 C50S) were produced. While those with non-acylated M2 grew like wildtype virus, the growth of the double acylation mutant was reduced by one order of magnitude compared to HA Ac1 containing

virus, and by two orders of magnitude compared to the wildtype. This indicates that the acylations of HA and M2 are important for the same step in the viral replication cycle. The morphology and protein composition of the mutant viruses was not significantly altered compared to the wildtype, neither in the single mutants nor in the double mutant.

The third objective of this work was to investigate the role of the M2-AH, which is supposed to detect membrane curvature, to localise M2 to the neck of the budding virus and to accomplish membrane scission by inserting into the host cell membrane. Viruses without M2, without the M2-AH or with M2 containing a helix with reduced amphiphilicity could not be produced in this work. However, substituting the AH by typical curvature-sensing or -generating helices led to viruses with two to four orders of magnitude reduced growth as compared to wildtype virus. The amphiphilicity of the helix seems to be important, but also the sequence or specific amino acids appear to be necessary for an efficient virus replication.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
SUMMARY	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Influenzaviren.....	1
1.1.1 Aufbau.....	2
1.1.2 Infektionszyklus	3
1.1.3 Assemblierung und Knospung	5
1.2 Membranbiologie.....	6
1.2.1 Membran-Rafts	6
1.2.2 S-Acylierung	9
1.2.3 Bedeutung der Rafts für Influenza-A-Viren	10
1.2.4 Deformation biologischer Membranen	11
1.2.5 Amphiphile Helices als Krümmungsinitiator und -sensor	12
1.2.6 Vesikelabschnürung von Membranen.....	13
1.2.7 Kräfte der Knospung von Influenzavirus A	15
1.3 Hämagglutinin	16
1.3.1 Struktur und Funktion	16
1.3.2 Raft-Assoziation.....	18
1.4 Protein M2	21
1.4.1 Struktur und Funktion	21
1.4.2 Amphiphile Helix.....	22
1.5 Zielsetzungen	24
2 MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Zellen	27
2.1.2 Plasmide, Oligonukleotide, Peptide und Proteinsequenzen.....	27
2.1.3 Chemikalien	32
2.1.4 Kits	32
2.1.5 Enzyme und molekularbiologische Reagenzien	32
2.1.6 Lösungen und Medien.....	33
2.1.7 Antikörper	35
2.1.8 Verbrauchsgüter und Geräte	35
2.1.9 Computergestützte Analysen, Datendokumentation und -verarbeitung	36
2.1.10 Firmensitze.....	37
2.2 Methoden	37
2.2.1 Molekularbiologie - Gentechnische Konstruktion von Plasmiden	37
2.2.2 Zellkultur und Mikroskopie	41
2.2.3 Biochemische Methoden.....	48
2.2.4 Virologische Methoden.....	51

3	ERGEBNISSE	55
3.1	Acylierung und CRAC-Motive von M2 werden nicht für dessen apikalen Transport benötigt	55
3.2	FLIM-FRET-Messungen zur Bedeutung der (putativen) Raft-Lokalisationssignale von HA und M2 für deren Assoziation.....	57
3.2.1	HAs Raft-Assoziationsmotive werden für das Clustern mit M2 benötigt.....	60
3.2.2	M2s CRAC-Motive und Acylierung werden nicht für das Clustern mit HA benötigt.....	62
3.3	Untersuchung einer möglichen Synergie zwischen den Acylierungen von HA und M2 im viralen Kontext.....	65
3.3.1	Herstellung rekombinanter Influenzaviren mit Mutationen in HA und M2	65
3.3.2	Viren mit fehlender Acylierung in HA und M2 wachsen schlechter als Viren, die nur unteracyliertes HA besitzen	67
3.3.3	Die Morphologie der Mutanten ähnelt der von Wildtypviren.....	72
3.3.4	Die Viruspartikelzusammensetzung der Mutanten ist nicht signifikant verändert	73
3.3.5	Zusammenfassung	78
3.4	Mutagenese der amphiphilen Helix (AH) von M2.....	79
3.4.1	Herstellung rekombinanter Influenzaviren mit Mutationen der M2-AH	79
3.4.2	Die M2-Helix-Mutanten wachsen schlechter als Wildtypviren	82
3.4.3	Die M2-Varianten wirken nicht cytotoxisch	84
3.4.4	Die Inkorporation von M2-Epsin und M2-RW16 in Viruspartikel ist reduziert.....	85
3.4.5	Zusammenfassung	86
4	DISKUSSION	87
4.1	HAs Acylierungen	87
4.1.1	HAs Acylierungen sind von Bedeutung für das Clustern mit M2	87
4.1.2	HAs Acylierungen sind wichtig für Herstellung und Wachstum rekombinanter Viren	90
4.2	Acylierung und Cholesterol-Bindemotive von M2	98
4.2.1	M2s Acylierung und CRAC-Motive werden nicht für den apikalen Plasmamembrantransport benötigt.....	98
4.2.2	Acylierung und CRAC-Motive von M2 sind nicht essenziell für die Assoziation mit stabilisierten Raft-Domänen	99
4.3	Zwischen der Acylierung von HA und M2 existiert eine Synergie	101
4.4	Die amphiphile Helix von M2	105
4.4.1	Viren ohne M2 oder mit Deletion der AH können nicht hergestellt werden	105
4.4.2	Die AH kann durch andere amphiphile Helices teilweise funktionell ersetzt werden.....	107
4.4.3	Die Amphiphilität der cytoplasmatischen M2-Helix ist vermutlich wichtig	111
4.5	Ausblick	115
	LITERATURVERZEICHNIS.....	117
	VERÖFFENTLICHUNGEN	139
	DANKSAGUNG.....	141
	LEBENS LAUF	143
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	145

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Nicht aufgeführt sind SI-Einheiten und ihre Präfixe, chemische Elemente sowie übliche Abkürzungen der deutschen Schriftsprache. Die Abkürzungen für Aminosäuren sowie Nukleinsäure-Basen sind in gesonderten Verzeichnissen weiter unten aufgeführt.

Å	Ångström (10^{-10} m/0,1 nm)
Ac	Acylierung
AH	amphiphile Helix
ALPS	engl. <i>amphipathic lipid packing sensor</i>
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (amerikanische Zellsammlung)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Carboxy
CD	engl. <i>circular dichroism</i> , Zirkulardichroismus
cDNA	DNA-Kopie einer RNA (c: engl. <i>copy</i>)
Cer	Cerulean, eine Variante des cyan fluoreszierenden Proteins
CHO	engl. <i>chinese hamster ovary (cells)</i> , Zelllinie aus dem Ovar des chinesischen Hamsters
CIP	engl. <i>calf intestinal phosphatase</i> , Phosphatase aus dem Kalbsdarm
COP	engl. <i>coat-protein-complex</i>
CP	cytoplasmatisch
CRAC	engl. <i>cholesterol recognition/interaction amino acid consensus</i> , Aminosäure-Konsensussequenz zur Erkennung von und Interaktion mit Cholesterol
Ct	engl. <i>cycle treshold</i> , Schwellenwert-Zyklus
dH ₂ O	Demineralisiertes und über Umkehrosmose weiter gereinigtes Wasser
DHHC	Asp-His-His-Cys
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
doi	engl. <i>digital object identifier</i> , Identifikationsnummer für digitale Objekte
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i> (Salzlösung nach Earle)

EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	engl. <i>endosomal sorting complex required for transport</i> , Proteinkomplex zum Einsortieren von Proteinen zum Transport in Endosomen
F	Vorwärts-Primer
FBS	engl. <i>fetal bovine serum</i> , fötales Rinderserum
FIP	engl. <i>family-interacting protein</i>
FLIM	engl. <i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i> , Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie
Flu	Influenzavirus
FPV	engl. <i>fowl plague virus</i> , Virus der klassischen Geflügelpest (KP)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m s}^{-2}$)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPMV	engl. <i>giant plasma membran vesicle</i> , Riesen-Plasmamembranvesikel
GUV	engl. <i>giant unilamellar vesicle</i> , gigantisches unilamellares Vesikel
h.p.i.	engl. <i>hours post-infection</i> , Stunden nach der Infektion
HA	Hämagglutinin
HEF	Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	engl. <i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IF	Immunfluoreszenz
IRF	engl. <i>internal response function</i> , interne Antwortfunktion
Kan ^r	Kanamycin-Resistenz
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton (1.000 g mol^{-1})
KP	Klassische Geflügelpest
L _d	engl. <i>liquid-disordered</i> , flüssig-ungeordnet
L _o	engl. <i>liquid-ordered</i> , flüssig-geordnet
M	mol l^{-1}
m.o.i.	engl. <i>multiplicity of infection</i> , Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle
M2CK	MDCK-Zellen, die konstitutiv Wt-M2 exprimieren
MDCK	engl. <i>Madin-Darby canine kidney (cells)</i> , Zelllinie aus der Hundeniere
MEM	engl. <i>minimum essential medium</i>
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

Myr	Myristoylierung
N	Amino
n.A.	numerische Apertur
NA	Neuraminidase
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEP	engl. <i>nuclear export protein</i> , Kernexportprotein
NMR	Nuklear-Magnetresonanz
NP	Nukleoprotein
NS1, NS2	Nichtstrukturprotein 1, 2
ORF	engl. <i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pal	Palmitoylierung
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit Tween-20
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PET	Polyethylenterephthalat (-Membran)
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque-forming units</i> , Plaque-bildende Einheiten
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid (-Membran)
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
R	Rückwärts-Primer
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein-Partikel
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SD	engl. <i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
SI	franz. <i>système international d'unités</i> , internationales Einheitensystem
SPAD	engl. <i>single photon avalanche photodiode</i> , Einzelphotonen-Lawinen-Photodiode
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCSPC	engl. <i>time-correlated single photon counting</i> , zeitaufgelöste Einzelphotonenzählung
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TMD	Transmembrandomäne
TPCK	N- <i>p</i> -Tosyl-L-Phenylalanin-Chlormethylketon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit (als relative Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolettes Licht
v	viral, Virus-
v/v	engl. <i>volume per volume</i> , Volumenprozent (ml/100 ml Lösung)
VLP	engl. <i>virus-like particle</i> , virusähnliches Partikel
w/v	engl. <i>weight per volume</i> , Gewichtsprozent pro Volumen (g/100 ml Lösung)
WB	Western Blot
WSN	<i>Wilson Smith neurotropic</i> , von Wilson Smith charakterisierter neurotroper Influenzavirusstamm
Wt	Wildtyp
YFP	engl. <i>yellow-fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein
YT	engl. <i>yeast-tryptone</i> , (Nährmedium aus) Hefe- und Tryptonextrakt
μH	hydrophobes Moment

Proteinogene Aminosäuren

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Theronin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
L	Leu	Leucin	X		beliebige As
M	Met	Methionin			

Basen der Nukleinsäuren

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracyl

1 EINLEITUNG

1.1 Influenzaviren

Influenza, auch „echte Grippe“ genannt, ist eine durch Viren der Gattung Influenzavirus A (seltener B) ausgelöste, akut respiratorische Infektionskrankheit des Menschen, deren Ursprung im zoonotischen Reservoir aquatischer Vögel liegt¹ und die sich hauptsächlich durch Tröpfcheninfektionen verbreitet. Im Rahmen der auftretenden Epidemien erkranken jährlich rund fünf Millionen Menschen schwer und bis zu 500.000 sterben². Darüber hinaus führt die Infektion von Geflügel und Schweinen jedes Jahr zu enormen wirtschaftlichen Einbußen³. Im letzten Jahrhundert gab es vier Pandemien, die schlimmste, die „spanische Grippe“, forderte von 1918-1920 bis zu 100 Millionen Todesopfer⁴. Im Jahr 2009 gab es eine Pandemie mit dem hochinfektiösen, aber wenig pathogenen Influenzastamm H1N1 („Schweinegrippe“)⁵. Das Auftreten humaner Infektionen mit dem hochpathogenen aviären Stamm H7N9 (2013) und sporadisch auftretende Infektionen mit der ebenfalls hochpathogenen „Vogelgrippe“ (H5N1) schüren die Sorgen vor dem Entstehen einer Pandemie mit einem hochpathogenen Virus, welches sich effektiv von Mensch zu Mensch überträgt^{6,7}.

Trotz intensiver Forschung sind die Kontrollmöglichkeiten einer Influenzavirus-Infektion bis heute limitiert, auch wenn in den letzten Jahren, durch zunehmendes Wissen über die zellulären Grundlagen einer Influenzavirus-Infektion, zahlreiche neue antivirale Agenzien identifiziert wurden und in Studien getestet werden^{6,7}. Eine wirksame, präventive Impfung stellt grundsätzlich die beste Schutzmaßnahme dar. Problematisch ist jedoch die kontinuierliche und schnelle evolutionäre Veränderung der viralen Oberflächen-Glykoproteine (Hämagglutinin, HA und Neuraminidase, NA) sowie der sporadisch auftretende Austausch kompletter Genomsegmente zwischen verschiedenen Stämmen⁸. Ein Ziel derzeitiger Forschung ist es daher einen Universalimpfstoff zu entwickeln, der gegen Antigenepitope gerichtet ist, die in allen Influenzasubtypen stark konserviert sind. Vielversprechende Kandidaten sind hier das Protein M2 und die Stieldomäne des HA^{6,7,9}.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Influenza-A-Viren und soll helfen, die Grundlagen des Ablaufs einer Influenzavirus-Infektion und die Bedeutung einzelner viraler Proteine dafür aufzuklären und somit zur Etablierung neuer, wirksamer Medikamente gegen Influenzaviren beizutragen. Folgend werden zunächst die Grundlagen und der Stand der aktuellen Forschung vorgestellt. Nach der Beschreibung von Aufbau und Infektionszyklus der Influenzaviren werden die Grundlagen der Membranbiologie, die für die Knospung der umhüllten Viren von großer Bedeutung sind, dargestellt. Schließlich werden die viralen Proteine HA und M2, die

zentraler Bestandteil dieser Arbeit sind, ausführlich vorgestellt und die Zielsetzungen der Arbeit benannt.

1.1.1 Aufbau

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* und besitzen eine pleomorphe Gestalt, die sphärisch (d ~100 nm) oder filamentös (mit Längen bis zu einigen Mikrometern) sein kann^{10,11} (Abb. 1B). Es handelt sich um umhüllte Viren, deren segmentiertes Genom etwa 12 kbp groß ist¹² und aus linearer, einzelsträngiger RNA negativer Polarität besteht¹¹. Die insgesamt acht Genomsegmente kodieren für zehn essenzielle und, abhängig vom Stamm, für bis zu sieben weitere akzessorische Proteine, was durch Strategien wie alternatives mRNA-Spleißen oder eine Verschiebung des ribosomalen Leserahmens trotz des relativ kleinen Genoms erreicht wird^{13–15}. Aufgrund des fehlenden Korrekturlesemechanismus für RNA treten kontinuierlich Punktmutationen auf (Antigendrift) und während einer Koinfektion mit verschiedenen Influenzastämmen kann es zum Austausch kompletter Genomsegmente kommen (Antigenshift), so dass Influenzaviren genetisch hoch flexibel und anpassungsfähig bezüglich ihrer Wirte sind^{6,16}.

Das Glykoprotein HA ist das Haupthüllprotein des Virus und, neben der Neuraminidase, das Haupt-Oberflächenantigen (s. Abb. 1A, Für eine ausführliche Betrachtung von HA siehe Kap. 1.3). Die beiden Proteine ragen als Spikes etwa 10-14 nm aus der Virusoberfläche heraus⁸ und werden zur Klassifizierung der verschiedenen Stämme von Influenzaviren (z.B. H1N1, H3N2 usw.) genutzt. Bis heute wurden 18 verschiedene HA- und 11 NA-Subtypen von Influenzavirus A identifiziert^{7,17}. Ebenfalls in der Virushülle befinden sich geringe Mengen des Protonenkanalproteins M2, das in Kap. 1.4 ausführlich betrachtet wird. Das Matrixprotein M1 bildet eine Schicht unterhalb der Virushülle und umschließt das virale Genom. Jedes genomische RNA-Segment bildet zusammen mit den für die Replikation benötigten Proteinen, den Polymerase-Bindeproteinen PB1 und PB2 und der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase (PA), und Nukleoprotein (NP) einen helikalen Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) (vgl. Abb. 1A). Des Weiteren enthalten Viren geringe Mengen des Proteins NEP (*nuclear export protein*), auch als Nicht-Struktur-Protein NS2 bezeichnet^{18,19} und kodieren für regulatorische Proteine, die nicht im Virus vorkommen, wie z.B. NS1, ein Interferon-Antagonist, der zudem das Ausschleusen wirtseigener mRNA aus dem Zellkern unterbindet, wodurch die Translation viraler Proteine vorrangig erfolgt²⁰, das Protein PA-X^{21,22}, welches ebenfalls an der Modulation der Wirtszellantwort auf die Infektion beteiligt ist oder das Protein N40²³. Manche Stämme besitzen das proapoptotische Protein PB1-F2^{24,25}.

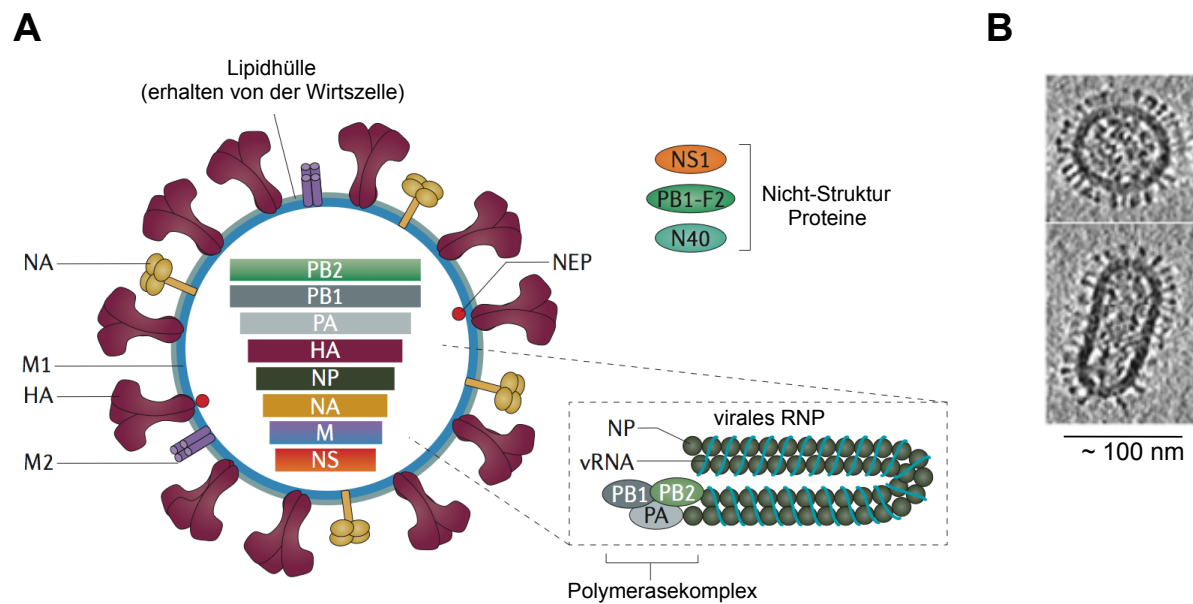


Abb. 1: Aufbau von Influenza-A-Viren. **A:** Schematische Darstellung eines sphärischen Influenzaviruspartikels mit den Membranproteinen Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und M2, dem Matrixprotein M1 sowie den viralen Ribonukleoprotein-Partikeln (vRNPs), bestehend aus Nukleoprotein (NP), viraler RNA (vRNA) und dem Polymerasekomplex aus den Polymerase-Bindeproteinen (PB1, PB2) und der RNA-Polymerase (PA). Kleine Mengen des Kernexportproteins (NEP) sind ebenfalls in Viren enthalten. Gezeigt sind auch die Nicht-Struktur-Proteine NS1, PB1-F2 und N40, s. Text für Erläuterungen. Modifiziert nach Medina & Garcia-Sastre¹⁶. **B:** Kryo-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Influenzaviruspartikeln, entnommen aus Harris *et al.*²⁶.

1.1.2 Infektionszyklus

Der Infektionszyklus von Influenza-A-Viren ist in Abb. 2 dargestellt und im Übersichtsartikel von Matsuoka *et al.*¹² beschrieben. Die Infektion beginnt damit, dass das HA-Glykoprotein über seinen globulären Kopfbereich an endständige Sialinsäuremoleküle (5-N-Acetyl-Neuraminsäure) von Glykoproteinen oder -lipiden der Wirts-Epithelzellen bindet. Sialinsäure ist auf den meisten Zelloberflächen vorhanden, die Art ihrer glykosidischen Bindung an Galaktose legt das Wirtsspektrum fest²⁷: α -2,3-verknüpfte Sialinsäuren werden von aviären HA-Proteinen erkannt und befinden sich im Darmepithel von Vögeln²⁸, α -2,6-verknüpfte Sialinsäuren werden von humanpathogenen Influenzaviren präferiert und sind die vorherrschende Form im oberen Respirationstrakt des Menschen²⁹. Unterschiede in der HA-Spezifität sind somit kritische Determinanten des Wirtsspektrums^{30,31}.

Der Virus-Rezeptorkomplex wird vornehmlich durch Clathrin-vermittelte Endocytose internalisiert^{32,33}, aber auch Clathrin-unabhängige Endocytose³⁴ als auch Makropinocytose³⁵ wurden beobachtet. Durch den niedrigen pH-Wert der späten Endosomen (etwa 6-4,9³⁶) wird der Protonenkanal im Protein M2 aktiviert, und Protonen aus dem Endosomen in das Virusinnere befördert. Diese Ansäuerung ist nötig um das Matrixprotein M1 von den vRNP-Komplexen

abzulösen³⁷. Der niedrige pH-Wert löst auch eine Konformationsänderung im HA aus (s. a. Kap.1.3.1), die zur Fusion der viralen mit der endosomalen Membran und somit zur Freisetzung der vRNPs in das Cytosol der Wirtszelle führt. Über das Kernlokalisierungssignal des NP-Proteins werden die vRNPs in den Zellkern importiert^{38,39}, wo die Synthese viraler mRNAs sowie die RNA-Replikation stattfindet^{40,41}.

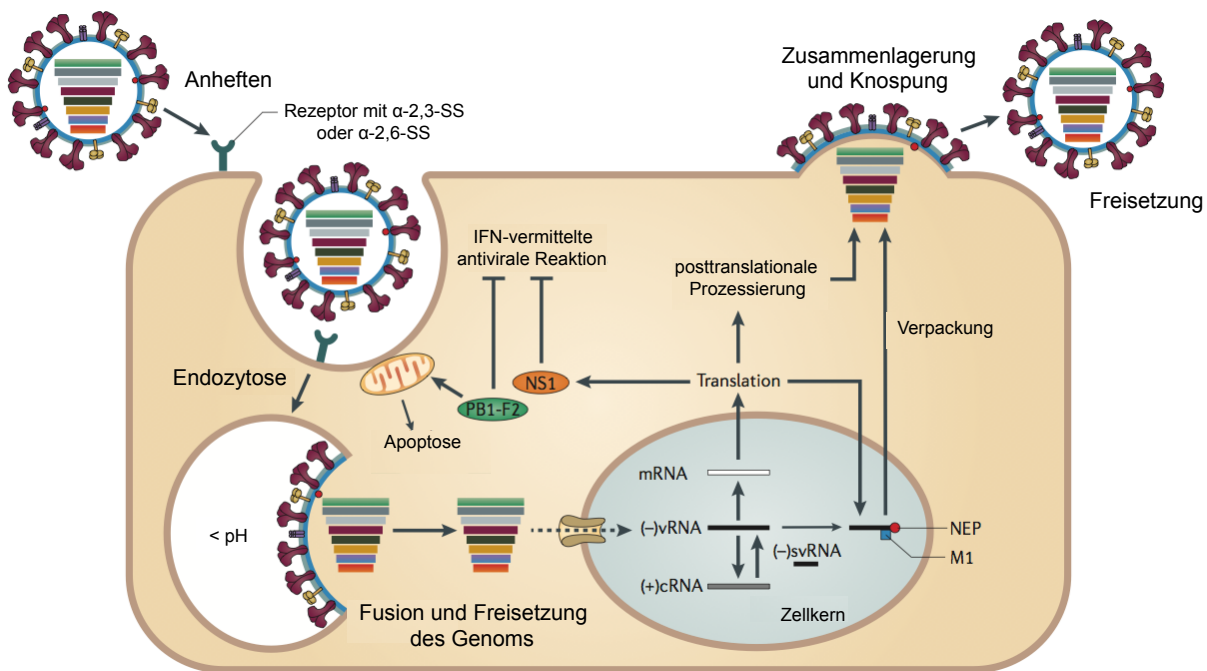


Abb. 2: Infektionszyklus von Influenzaviren. Nach Anheften des Virus an die Wirtszelle, vermittelt durch das Oberflächenprotein HA, erfolgt die Internalisierung per Endozytose. Der sinkende endosomale pH-Wert führt zur HA-vermittelten Fusion von viraler und endosomaler Membran. Das virale Genom wird im Cytoplasma der Wirtszelle freigesetzt und in den Zellkern transportiert, wo die Replikation und Transkription stattfindet. Die viralen Proteine werden im Cytoplasma, gegebenenfalls am ER, synthetisiert und in den Zellkern oder direkt zur Plasmamembran transportiert. Virale Ribonukleoprotein-Partikel (vRNPs) werden im Zellkern gebildet und (vermittelt durch M1 und NEP) zur Plasmamembran gebracht, wo die Assemblierung, Knospung und Freisetzung neuer Viren erfolgt. Modifiziert nach Medina & Garcia-Sastre¹⁶. SS = Sialinsäure

Solch eine nukleare Lokalisation ist ungewöhnlich für RNA-Viren und bietet den großen Vorteil, dass eine direkte Interaktion mit der Wirtsmaschinerie möglich ist. So wird die 5'-Kappe für die viralen mRNAs, die für die Translation durch die Wirtspolymerase benötigt wird, von prä-mRNAs des Wirtes per „cap-snatching“ erhalten⁴². Gegebenenfalls werden die viralen (prä-) mRNAs vor der im Cytoplasma stattfindenden Proteinsynthese gespleißt. Früh synthetisiert werden die Proteine NS1⁴³, NP⁴⁴ und die Polymerase-Untereinheiten (PA, PB1, PB2)⁴⁵, die für die Replikation und Transkription benötigt und nach ihrer Synthese wieder in den Zellkern transportiert werden⁴⁶. Dort bilden sich neue vRNP-Komplexe, deren Transport ins Cytoplasma und anschließend zur Plasmamembran durch die spät synthetisierten Proteine M1 und NEP vermittelt wird^{47–49} und entlang von Mikrotubuli erfolgt^{40,50}. Die Proteine HA, NA und

M2 werden an, am endoplasmatischen Retikulum (ER) gebundenen Ribosomen, synthetisiert, im Zuge des sekretorischen Weges glykosyliert (HA, NA)⁵¹ und acyliert (HA, M2)⁵² und schließlich zur apikalen Zellplasmamembran transportiert⁵³. Dort findet der komplexe Mehrschritt-Prozess der Assemblierung neuer Viren statt, bei dem die Wirtszellmembran zunächst nach außen gewölbt und anschließend neue Viren durch Abschnürung von der Wirtszelle freigesetzt werden. Dies wird im folgenden Kap. 1.1.3 detailliert betrachtet.

1.1.3 Assemblierung und Knospung

Eine Übersicht der Knospung von Influenza-A-Viren findet sich in Refs. 54, 55 und in Abb. 3. Die Knospung erfolgt an der apikalen Plasmamembran der Wirtszelle an Membran-Rafts⁵⁶⁻⁵⁸ (Kap. 1.2.1). Über interne Raft-Lokalisationssignale werden zunächst die viralen Glykoproteine HA und NA zur Membran gebracht und definieren dort die Knospungszone durch Bildung größerer, stabilisierter Raft-Domänen^{55,57-59}. Vermutlich durch Bindung im Carboxy (C)-terminalen Bereich von HA und NA wird das Matrixprotein M1, zur Knospungszone rekrutiert^{54,55,60}. Entsprechend zeigen Viren in denen die cytoplasmatischen (CP) -Bereiche von HA und NA fehlen, starke Defekte bei der Assemblierung, in ihrer Morphologie und beim Verpacken der vRNPs⁶¹. Die Effekte sind weniger ausgeprägt, wenn nur der CP-Bereich eines der beiden Proteine fehlt⁶². M1 polymerisiert und dient durch seine Fähigkeit mit der Membran und allen viralen Komponenten zu interagieren als eine Art „Brücke“ und Hauptorganisator der viralen Assemblierung^{55,58}. Es rekrutiert zunächst die acht vRNPs^{63,64}, welche segmentspezifische Verpackungssignale in der vRNA aufweisen¹⁴ und nach ihrer Synthese im Nukleus in Rab11-positiven Vesikeln entlang von Mikrotubuli zur Zellperipherie transportiert werden^{40,41,65}. M1 rekrutiert auch kleine Mengen des spät exprimierten M2-Proteins^{55,66-69}, dessen C-terminaler Teil ebenfalls an der Inkorporation der vRNPs beteiligt sein könnte⁷⁰. M2 ist für die finalen Schritte der Knospung, speziell das Abschnüren von der Wirtszelle, von entscheidender Bedeutung (s. Abb. 3C und Kap. 1.4.2). Damit die neu entstandenen Viren schließlich von der Wirtszelle abgelöst werden können, entfernt die Neuraminidase Sialinsäuren von der viralen und der Wirtszelloberfläche⁸.

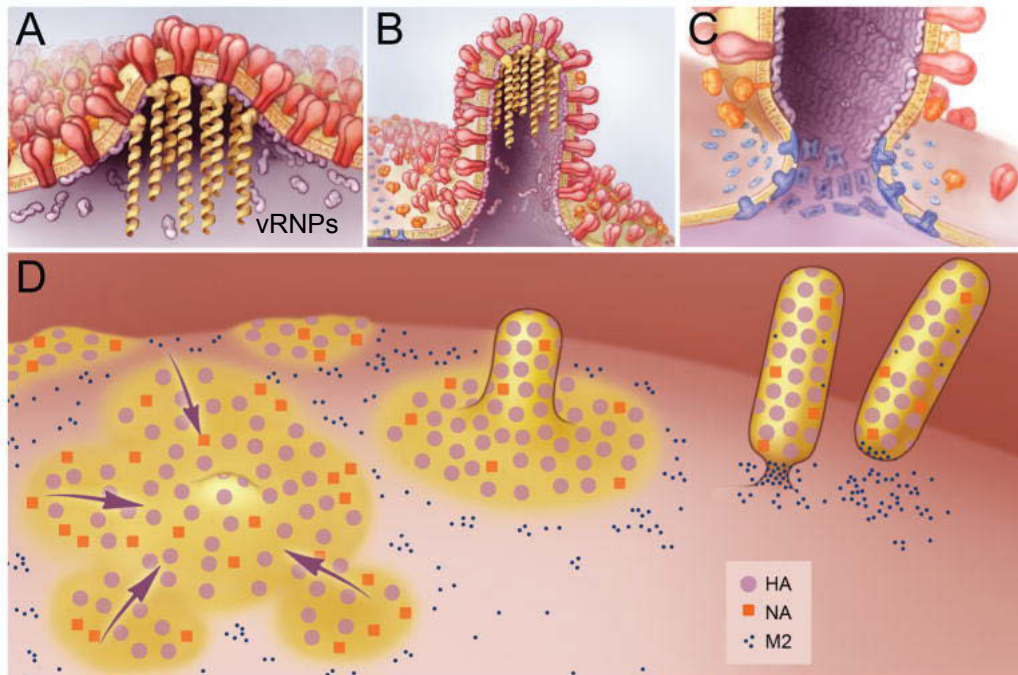


Abb. 3: Assemblierung und Knospung von Influenzaviren. **A:** Das Zusammenlagern von HA (rot) und NA (orange) initiiert an Membran-Raft-Domänen die Knospung. M1 (lila) bindet an CP-Bereiche von HA und NA, stabilisiert so die Knospungszone und fungiert als „Brücke“ zwischen den viralen Komponenten. Zunächst rekrutiert M1 die vRNPs (gelb). **B:** Die Oligomerisierung des M1 führt zur Elongation der Knospe. M1 rekrutiert auch das Protein M2 (blau), welches an der Peripherie der Knospungszone lokalisiert ist. **C:** Durch Insertion der amphiphilen Helix des M2-Proteins an der Lipidphasengrenze wird die Krümmung am Hals der knospenden Viren verändert und das Virus von der Wirtszelle freigesetzt. **D:** Übersicht des Knospens von Influenzaviren: Initial lagern sich HA und NA an Membran-Raft-Domänen (gelb) zusammen wodurch die Knospungszone ausgebildet wird. Die Membran wird nach außen gewölbt und M2 vermittelt am Hals der knospenden Viren die Abspaltung von der Wirtszelle. Entnommen aus Ref. 55.

1.2 Membranbiologie

Da Influenzaviren von der Plasmamembran der Wirtszelle knospen und dort spezielle Zusammenlagerungen, sogenannte Rafts, benötigen, werden diese und weitere relevante Aspekte der Zusammensetzung zellulärer Membranen sowie die potenziellen zur Membrandeformation und Vesikelabschnürung führenden Mechanismen und Kräfte folgend beschrieben. Anschließend wird zusammengefasst, welche Kräfte zur Knospung von Influenzaviren beitragen.

1.2.1 Membran-Rafts

Biologische Membranen bestehen aus unterschiedlichsten Lipiden, die sich aufgrund ihrer Amphiphilität über den hydrophoben Effekt spontan zu einer Doppelmembran zusammenlagern (Abb. 4A). Sie können als komplexe zweidimensionale Flüssigkeit betrachtet werden, die das Zellinnere von der Umgebung abgrenzen und auch eine interne Kompartimentalisierung ermöglichen. Eingelagert in die Membran oder peripher assoziiert befinden sich zahlreiche Proteine, die die diversen zellulären Stoffwechselfunktionen bewerkstelligen^{71,72}. Eukary-

otische Membranlipide sind in erster Linie Glykerophospholipide und Sphingolipide, von denen es hunderte verschiedene Lipidspezies gibt, und Cholesterol. Letztere liegen aufgrund ihrer stabilisierenden Eigenschaften besonders konzentriert in der Plasmamembran vor⁷². Nicht nur die Zusammensetzung beider Membranschichten ist asymmetrisch⁷³, sondern es liegt auch eine laterale Subkompartimentierung innerhalb einer einzelnen Membranschicht vor, die durch Proteine unter wenig Energieaufwand modifiziert werden kann und die benötigt wird, um die vielfältigen Funktionen der Zellmembran zu koordinieren⁷⁴. Diese laterale Subkompartimentierung ist zentraler Bestandteil der Raft-Hypothese, die Lipiden eine Schlüssel-funktion bei der Regulation der Proteindiffusion und -interaktion zuweist^{75,76}. Sie basiert auf der Tatsache, dass Lipide (abhängig von ihrer Beschaffenheit und Umgebung) verschiedene Phasen bilden können, die durch unterschiedliche physikalische Eigenschaften charakterisiert sind und innerhalb derselben Membranebene koexistieren können^{72,77}. Dementsprechend sind biologische Membranen ein Gemisch aus „flüssig-geordneten“ (L_o -Phase, oder Rafts) und „flüssig-ungeordneten“ Domänen (L_d -Phase), s. Abb. 4B. In der Raft-Phase befinden sich vornehmlich Cholesterol und Sphingolipide (die bevorzugt miteinander interagieren) sowie gesättigte Phospholipide mit längeren Kohlenwasserstoffketten. Aufgrund der starren Eigenschaften ihrer Lipidbestandteile ist die L_o -Phase geordnet, dicht gepackt und in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt. Die Interaktion von Cholesterol mit benachbarten Kohlenwasserstoffketten zwingt diese zudem in eine gestrecktere Konformation. Insgesamt ist die Membran im Bereich der Rafts dicker, als in der L_d -Phase, die vornehmlich ungesättigte und verzweigte Phospholipide enthält und weniger dicht gepackt ist^{74,78–80}. Aktuell werden Rafts als kleine (10–200 nm), hoch dynamische, heterogene Zusammenlagerungen bestimmter Lipide und Proteine, die reich an Sterolen (hauptsächlich Cholesterol) und Sphingolipiden sind, definiert, deren metastabiler Ruhezustand durch spezifische Lipid-Lipid, Protein-Lipid oder Protein-Protein Wechselwirkungen aktiviert werden kann. Dies führt zur Bildung größerer, stabilerer Raft-Plattformen, die der Kompartimentalisierung zellulärer Prozesse dienen können, indem bestimmte Proteine inkorporiert und andere ausgeschlossen werden^{74,81–83} (vgl. Abb. 4C und D). Rafts sind an einer Vielzahl zellulärer Membranprozesse beteiligt, wie der Signaltransduktion (z.B. T-Zellaktivierung) und dem intrazellulären Transport^{74–76,84–86}. Viele Viren nutzen Rafts für den Eintritt in die Wirtszelle, oder, wie Influenza-A-Viren auch, für die Assemblierung neuer Viruspartikel und die Konzentration ihrer Proteine im Zuge der Knospung^{87–89}. Inzwischen wird angenommen, dass zelluläre Membranen so zusammengesetzt sind, dass sie sich in einer gemischten Gleichgewichtsphase befinden, die nahe an dem kritischen Punkt für eine Phasentrennung ist, so dass bereits kleine Änderungen in der Lipid- und Proteinzusammenset-

zung und der Umgebung das Gleichgewicht zwischen Ordnung und Unordnung beeinflussen und somit eine Phasenseparation herbeiführen können⁹⁰. Dies würde einerseits eine proteinbasierte Regulation mit wenig Energieaufwand ermöglichen, aber andererseits auch eine starke Regulation (über die Lipid- und Proteinzusammensetzung) erfordern^{74,82}.

Während die Raft-Hypothese in Modellmembransystemen (z.B. großen unilamellaren Vesikeln (GUVs) oder auch großen Plasmamembranvesikeln (GPMVs)) relativ einfach, beispielsweise durch Visualisierung der Phasentrennung per Fluoreszenzmikroskopie, belegt werden konnte, war ihr Nachweis in lebenden Zellen schwieriger, was Zweifel an der Existenz von Rafts aufkommen ließ^{72,82,84,91}. Biochemische und biophysikalische Methoden waren oft fehlerbehaftet und lieferten widersprüchliche Ergebnisse^{76,83}. Lange diente die Detergenzresistenz, bei der sich mit kaltem nicht-ionischem Detergenz, wie TritonX-100, Raft-Lipide und die enthaltenen Proteine aus Zellmembranen fraktionieren lassen, als Kriterium für die Raft-Assoziation eines Proteins^{92,93}. **Förster's Resonanzenergietransfer (FRET)** ist der strahlungslose Transfer von Energie von einem angeregten Donor-Fluorophor auf ein geeignetes FRET-Akzeptor Fluorophor und findet statt, wenn sich die zwei Fluorophore in starker räumlicher Nähe (< 10 nm) befinden (vgl. Kap. 2.2.2.7). Daher ist FRET hervorragend dafür geeignet, die Interaktion zwischen zwei Proteinen, welche mit einem geeigneten Fluorophor markiert sind, nachzuweisen und kann beispielsweise zeigen, ob ein Protein mit einem Raft-Marker-Protein interagiert, oder ob zwei Proteine in der gleichen Raft-Domäne lokalisiert sind^{58,94}. Die Fluoreszenzmikroskopie war aufgrund ihrer Nichtinvasivität lange ein beliebtes Werkzeug zur Untersuchung von Rafts. Die Beugungseigenschaften des Lichtes erlaubten jedoch nur eine Auflösung bis zu 200 nm, was bereits die postulierte obere Grenze der Raft-Größe darstellt⁷⁶. Insgesamt waren die bis dato verfügbaren bildgebenden Verfahren zu wenig auflösend und dynamisch, um die kleinen Rafts in lebenden Zellen direkt zu visualisieren^{83,84}. Die Etablierung neuer, hochauflösender (im Bereich weniger nm) optischer Methoden, mit schnellerer Bildaufnahmefolge erlaubte es schließlich, Beweise für die Existenz der Rafts in lebenden Zellen zu generieren, ihre strukturellen Komponenten zu analysieren und auch zu identifizieren, dass das Cytoskelett für die Organisation der Raft-Domänen oftmals von Bedeutung ist^{76,95–97} (vgl. Abb.4C und D). Zu diesen hochauflösenden Methoden zählen Einzelmolekültechniken wie PALM (*photo-activated localisation microscopy*)⁹⁸ und Methoden wie STED (*stimulated emission depletion*)-Mikroskopie⁹⁹ oder SIM (*structured illumination microscopy*)-Mikroskopie¹⁰⁰.

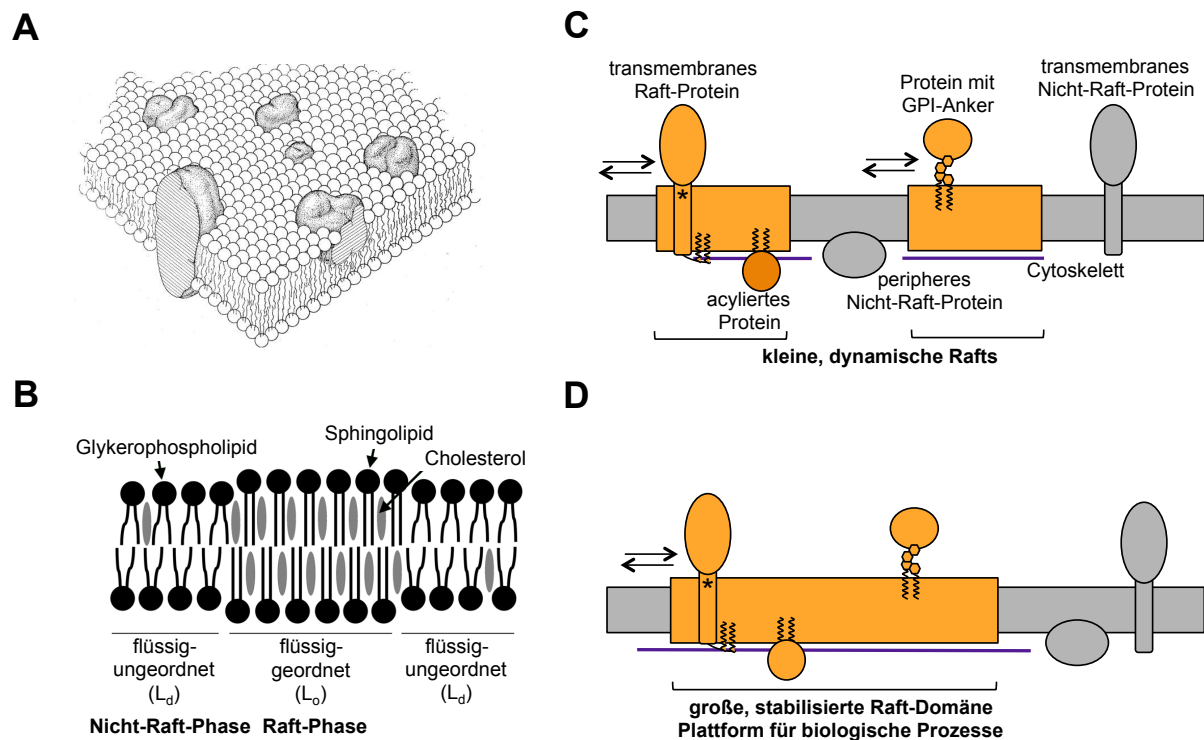


Abb. 4: Biologische Membranen und Membran-Rafts. **A:** Flüssigmosaikmodell der aus Lipiden und Proteinen bestehenden Membran. Entnommen aus Singer & Nicolson⁷¹. **B:** Modell der lateralen Phasenbildung in Membranen. Die Raft-Phase (L_o, „flüssig-geordnet“) ist reich an gesättigten Glykophospholipiden, Sphingolipiden und Cholesterin und dicker als die Nicht-Raft-Phase (L_d, „flüssig-ungeordnet“), die vornehmlich aus ungesättigten Glykophospholipiden besteht. Modifiziert nach Thaa¹⁰¹. **C:** Im Ruhezustand liegen in der Plasmamembran kleine, dynamische Rafts vor, die die charakteristischen Raft-Lipide und -Proteine enthalten. Die Zusammensetzung variiert dynamisch (dargestellt durch zwei Pfeile) und wird durch das Cytoskelett (lila Linie) moduliert. Typische Raft-Proteine sind solche mit Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker⁹² sowie doppeltacylierte (gewellte Linien) cytosolische oder transmembrane Proteine. Letztere enthalten oft zusätzlich bestimmte Lipidinteraktionsmuster in der Transmembrandomäne (*)^{102,103}. Nicht-Raft-Proteine werden aus diesen Zusammenlagerungen ausgeschlossen. **D:** Im Zuge biologischer Prozesse können aus den kleinen Rafts größere, stabilere Plattformen gebildet werden, die beispielsweise für die Signaltransduktion oder die Bildung der viralen Knospungszone von Bedeutung sind und an deren Ausbildung und Aufrechterhaltung oft das Cytoskelett beteiligt ist.

Raft-Proteine, wie das Protein HA von Inflenzaviren, besitzen oft eine doppelte S-Acylierung (vgl. Abb. 4C), ein typisches Raft-Assoziationsmotiv, welches im folgenden Kap. 1.2.2 detailliert behandelt wird.

1.2.2 S-Acylierung

Die S-Acylierung („Palmitoylierung“) ist eine in eukaryotischen Zellen und Viren weit verbreitete posttranslationale Modifikation integraler oder peripherer Membranproteine, bei der eine Fettsäure (gewöhnlich Palmitat, C 16:0) über eine Thioesterbindung an die Thiolgruppe eines Cysteins angeheftet ist^{52,104}. Die Mehrzahl der integralen Raft-assoziierten Proteine besitzt eine doppelte S-Acylierung, die als Raft-Signaturmotiv fungiert⁸⁹ (Abb. 4C). Acylierungen können aber auch der Verankerung eines Proteins in der Membran oder der Stabilisierung der Wechselwirkung mit einer Membran dienen¹⁰⁵. Viele virale Spike-Glykoproteine sind

acyliert, wie das F-Protein des Masernvirus, Glykoproteine von Retroviren und auch HA von Inflenzaviren (Kap. 1.3). Die Acylierung findet typischerweise im Zuge des sekretorischen Weges im späten ER oder frühen Golgi-Apparat statt¹⁰⁶ und ist wahrscheinlich irreversibel⁵². Die dafür verantwortlichen zellulären Enzyme sind noch nicht identifiziert, gehören aber vermutlich zur Familie der DHHC-Proteine (mit dem cytoplasmatischen Asp-His-His-Cys-Motiv), von denen bisher 23 Mitglieder im Menschen identifiziert wurden und die nur teilweise überlappende Substratspezifitäten aufweisen¹⁰⁷. Interessanterweise wird an einige Cysteine bevorzugt Stearat (C 18:0) statt Palmitat (C 16:0) angefügt¹⁰⁸, wobei die Position der Acylierungsstelle relativ zur Transmembrandomäne (TMD) das Hauptsignal für das Anfügen von Stearat zu sein scheint und die Umgebungssequenz und der Zelltyp ebenfalls einen (geringeren) Einfluss besitzen¹⁰⁹. Die biologische Bedeutung der Stearoylierung gegenüber der Palmitoylierung ist allerdings noch unklar.

1.2.3 Bedeutung der Rafts für Influenza-A-Viren

Wie bereits vorhergehend beschrieben (Kap. 1.1.3), sind Rafts von zentraler Bedeutung bei der Initiation der viralen Knospung, indem sie die lokale Akkumulation der viralen Spike-Raft-Proteine, NA und HA, ermöglichen und vermutlich auch ihren Beitrag zur Krümmung und Ausstülpung der Membran leisten (s. a. Kap. 1.2.7). Darüber hinaus hängt die Membranfusionsaktivität des HA (vgl. Kap. 1.3.1) kritisch von dessen Oberflächendichte ab^{52,110}.

Es gibt auch Hinweise darauf, dass Rafts am **Transport** der viralen Transmembranproteine zur apikalen Plasmamembran der Epithelzellen, wo die Knospung erfolgt, beteiligt sind. Die intrinsischen Signale für den apikalen Transport von M2⁶⁶ sind bisher nicht identifiziert. Für NA und HA befinden sich die Signale in der TMD, überlappen aber nicht vollständig mit denen für die Raft-Assoziation^{111–114}, wobei der molekulare Transportmechanismus noch nicht vollkommen verstanden ist. Es wird aber postuliert, dass es neben dem auf Hüll- und Adaptorproteinen basierenden Mechanismus einen weiteren, lipidabhängigen Mechanismus zur Sortierung von Lipiden und Transmembranproteinen zur Zelloberfläche gibt^{115,116}, über den HA und NA zur apikalen Plasmamembran gelangen^{75,111,117,118}. Dieser Mechanismus basiert auf der Membran-Raft-Hypothese^{75,115} (Kap. 1.2.1) und nimmt an, dass Raft-Plattformen aus Sphingolipiden, Sterolen und zu transportierenden Proteinen durch Phasensegregation bereits im trans-Golgi-Netzwerk, der Hauptsortierstation für neu synthetisierte Lipide und Proteine in eukaryotischen Zellen¹¹⁹, gebildet werden⁷². In der Tat deuten einige Studien darauf hin, dass HA und NA während des apikalen Transports mit Raft-Mikrodomänen assoziieren^{112,117,120} und dementsprechend die Raft-Assoziationsmotive von Bedeutung für den apikalen Protein-

transport sind. Allerdings gibt es auch einige Arbeiten, wo in Mutanten zwar die Raft-Assoziation, nicht aber der apikale Transport reduziert war^{59,121,122}.

Nicht zuletzt werden Viren durch das Knospen über Rafts mit einer Lipidmischung ausgestattet, die die Viren stabilisiert und vor schädlichen Umwelteinflüssen schützt¹²³.

1.2.4 Deformation biologischer Membranen

Die Fähigkeit zur Deformation von Membranen spielt in allen biologischen Systemen eine essenzielle Rolle, z.B. für Zellwachstum und -teilung und intrazelluläre Transportprozesse. Komplexe Membrandeformationen müssen auch bei der Virus-Zell-Fusion^{124,125} und bei der Knospung umhüllter Viren^{69,126} erfolgen. In der Regel erfordert die Deformation einer biologischen Membran die Zufuhr von Energie, was gleichzeitig die Möglichkeit zur Regulation bietet, und ist das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels zwischen Membranlipiden und -proteinen und von auf die Membran wirkenden physikalischen Kräften, in dessen Folge die Lipide in der Doppelschicht umgeordnet werden^{127,128}.

Die **Lipidzusammensetzung** leistet oft einen entscheidenden Anteil, so führen beispielsweise sehr hohe Cholesterolkonzentrationen in Modellmembranen zu einer spontanen Krümmung bis hin zur Vesikelbildung^{129,130}. Es ist vorstellbar, dass auch der erhöhte Cholesterolgehalt von Membran-Rafts die Knospung von Viren begünstigt¹²⁷. Auch **Lipid-Phasen-Grenzen**, wie sie am Rand von Rafts vorliegen, fördern die Krümmung der Membran^{131,132}. Zwischen der L_o und L_d -Lipid-Phase besteht ein Höhenunterschied, so dass sich an der Phasengrenze die polaren Kopfgruppen der L_d -Domänen auf einer Höhe mit dem hydrophoben Kern der L_o -Domänen befinden (vgl. Abb. 4B). Dies ist energetisch ungünstig und übt eine als Linienspannung bezeichnete Kraft auf die Membran aus, die vergleichbar mit der Oberflächenspannung eines dreidimensionalen Systems ist. Dementsprechend können L_d -Phasen-Lipide mit stark geladenen Kopfgruppen die Linienspannung signifikant erhöhen, was energetisch sehr ungünstig ist und durch eine Krümmung der Membran entspannt werden kann^{80,133}. Ist die Linienspannung hoch genug, kann es sogar ohne weitere Proteine bis zur Abschnürung des Vesikels kommen^{134–138}. Allerdings sind dafür in den meisten biologischen Systemen **Proteine** nötig, die die Membranumgebung (und somit die Linienspannung) modifizieren⁸⁰. Ein weit verbreiteter Mechanismus membrankrümmender Proteine ist es, ein Gerüst entlang der Membran zu bilden und diese so zu krümmen. Ein Beispiel dafür ist die COP (*coat-protein-complex*) I und II vermittelte Vesikelknospung vom Golgi-Apparat bzw. ER^{127,139}. Solch ein Mechanismus könnte auch beim Knospen von Viren eine Rolle spielen. Hinweise dafür gibt es für das humane Immundefizienzvirus (HIV, *human immunodeficiency virus*)¹⁴⁰.

und auch für das Matrixprotein M1 von Influenzaviren wird eine solche Gerüstfunktion vermutet⁶⁴ (vgl. Kap. 1.2.7.).

1.2.5 Amphiphile Helices als Krümmungsinitiator und -sensor

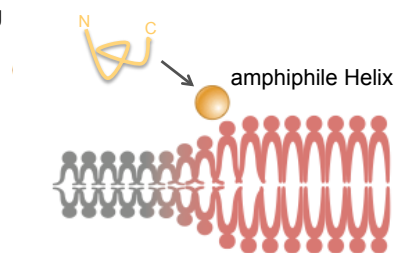
Zahlreiche Proteine inserieren mit hydrophoben Anteilen in Membranen und bewirken so ihre Krümmung (Übersicht in Shen *et al.*¹⁴¹). Oft wird dafür eine amphiphile Helix (AH) genutzt, die eine polare und eine hydrophobe Oberfläche auf sich gegenüberliegenden Seiten besitzt¹⁴² und die, wie in Abb. 5 dargestellt, in die Membran inseriert. Als Maß für die Amphiphilität einer Helix dient das hydrophobe Moment (μ_H)¹⁴³. Amphiphile Helices kommen z.B. in membrandestabilisierenden antibakteriellen Peptiden und als Promotor der Membrankrümmung in Gerüstproteinen des intrazellulären Transportes vor¹⁴⁴. Auch das M2-Protein von Influenzaviren besitzt eine AH (s. a. Kap. 1.4.2), deren genaue Funktion noch nicht geklärt und zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist.

Ein gut charakterisiertes Beispiel einer krümmungsinduzierenden AH findet sich im Protein **Epsin**, welches zur Bildung Clathrin-ummantelter Transportvesikel an der Plasmamembran beiträgt¹⁴⁵. Die hohe Affinität dieser Helix für Membranen wird über die elektrostatische Wechselwirkung mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) erreicht, was zur Ausbildung der amphiphilen Helix führt, die in der ENTH (*epsin N-terminal homology*)-Domäne, die auch in vielen anderen Proteinen vorkommt, lokalisiert ist. Die Helix von Epsin vermag in flache liposomale Membranen zu inserieren und diese anschließend zu tubulieren^{127,128,142}. Amphiphile Helices können aber auch der Detektion einer Membrankrümmung per elektrostatischer oder hydrophober Wechselwirkungen dienen^{146,147}. Dies ist ein in der Biologie ebenfalls wichtiger Prozess, der der Organisation und Regulation dient, indem beispielsweise Proteine an Membranen mit charakteristischer Krümmung lokalisiert werden oder eine enzymatische Aktivität in Abhängigkeit von der Membrankrümmung reguliert wird. Als Paradebeispiel für solch einen Krümmungssensor dient die amphiphile Helix des **ALPS** (*amphipathic lipid packing sensor*)-Motivs des Golgi-assoziierten Proteins ArfGAP1 (ADP-Ribosylierungsfaktor-GTPase-aktivierendes Protein-1)¹⁴⁸. Das Protein ArfGAP1 ist an der Regulation des Zusammenbaus von COP I ummantelten Transportvesikeln beteiligt. Seine Helix bindet nur an stark gekrümmte Membranen und koppelt so die Aktivität der GTPase im Protein Arf1 an die Krümmung der Membran^{142,144,148,149}. Die AH des ALPS-Motivs besitzt in ihrem polaren Bereich weniger positive Ladungen als krümmungsinduzierende amphiphile Helices, daher interagiert sie schwächer mit flachen Membranen. Sie ist jedoch sensibilisiert für die Detektion von Lipidpackungsdefekten, wie sie in gekrümmten Membranen auftreten,

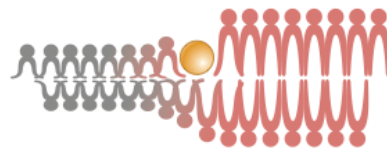
mit denen sie über ihren hydrophoben Anteil interagiert und als Resultat die Helix ausbildet^{147,150}.

Insgesamt wird angenommen, dass in der Regel verschiedene Mechanismen, z.B. Gerüst und AH, an der Deformation von Membranen beteiligt sind, was eine Robustheit gewährleistet und die nötige Feinregulation, z.B. über krümmungsdetektierende Proteine, ermöglicht¹²⁷. Neuere Publikationen werfen allerdings auch die Idee auf, dass der einfachste Weg zur Krümmung einer Membran der sein könnte, dass Membranen durch nur einen Mechanismus gekrümmt werden und dass dann krümmungsdetektierende Proteine die nachfolgenden Funktionen und das Schicksal der gekrümmten Membran steuern^{151,152}.

1. Helixausbildung



2. Insertion in die Membran



3. Membrankrümmung

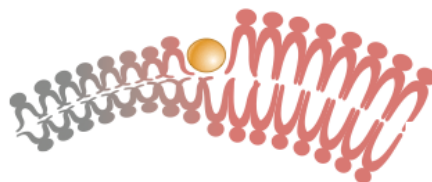


Abb. 5: Membrankrümmung durch Insertion einer amphiphilen Helix. AH-Peptide liegen im Cytoplasma zunächst oft unstrukturiert vor und akkumulieren über elektrostatische Wechselwirkungen nahe der Membran. Der hydrophobe Effekt bewirkt das Eintauchen hydrophober Anteile in eine Lipidschicht, z.B. an der Grenze von L_o -Phase (rot) und L_d -Phase (grau). Durch die Ausbildung einer parallel zur Membran orientierten α -Helix wird der Kontakt der polaren Peptidbindung mit der hydrophoben Membrenumgebung reduziert¹⁴². Die keilartige Helixinsertion führt zur Expansion der Lipidschicht und zu einer Asymmetrie zwischen den beiden Membranschichten, ein energetisch ungünstiger Zustand, der durch eine Krümmung der gesamten Membran ausgeglichen wird. Modifiziert nach Rossman & Lamb⁸⁰.

1.2.6 Vesikelabschnürung von Membranen

Ein wesentlicher Schritt sowohl bei der Bildung von Membranvesikeln als auch der Knospung von Viren ist das finale Abschnüren von der Ursprungsmembran. Hierfür wird zwischen Vesikel und Ursprungsmembran zunächst ein schmaler Hals gebildet, der durch die Wirkung von Proteinen weiter verengt wird, bis ein kritischer Durchmesser unterschritten wird und es zu einer spontanen Abspaltung kommt⁸⁰. Viele proteinbasierte Mechanismen der Abspaltung existieren in Zellen (Abb. 6). Wo der Zugang cytoplasmatischer Proteine gegeben ist, ist das Zusammenschnüren, wie bei der durch Dynamin- und Clathrin-vermittelten Endocytose, ein weit verbreiteter Mechanismus¹⁵³. Auch die Insertion einer AH in die Membran

kann zur Vesikelabschnürung führen und wird zum Beispiel bei der COP I und II vermittelten Vesikelknospung genutzt⁸⁰. Während diese Prozesse eine Endocytose in das Cytosol darstellen, handelt es sich bei der Knospung zellulärer Transportvesikel in Endosomen (MVB-*multivesicular bodies*), bei der Zellteilung und auch beim Knospen von Viren um eine Abschnürung von Vesikeln aus dem Cytosol in extracytosolische Kompartimente, bei der cytoplasmatische Proteine keinen Zugang zum Vesikelhals haben. Zellen nutzen hier die sogenannten ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Proteinkomplexe. Der ESCRT-III Komplex lagert sich von innen an den Membranhals an und schnürt diesen zusammen, so dass es zur Abspaltung der Vesikel kommt^{154–158} (vgl. Abb. 6B). Aufgrund der gleichen topologischen Gegebenheiten werden die ESCRT-Proteine auch von vielen RNA als auch DNA-Viren für unterschiedliche Schritte im Replikationszyklus und auch für die finale Abschnürung von der Wirtszelle genutzt^{80,159}. Für Influenzaviren konnte allerdings gezeigt werden, dass sie unabhängig von ESCRT-Proteinkomplexen die Wirtszelle verlassen^{160,161} und sie stattdessen vermutlich das virale Protein M2 und einen Mechanismus, der dessen AH involviert, nutzen, um die finale Abschnürung zu bewerkstelligen⁶⁹. Damit sind Influenzaviren bisher die einzigen Viren bei denen ein solches Protein identifiziert werden konnte⁸⁰. Das Protein M2 und seine Funktionen werden in Kap. 1.4 ausführlich betrachtet. Die Kräfte, von denen man annimmt, dass sie das Knospen von Influenzaviren bewirken, sind im folgenden Kap. 1.2.7 zusammengefasst.

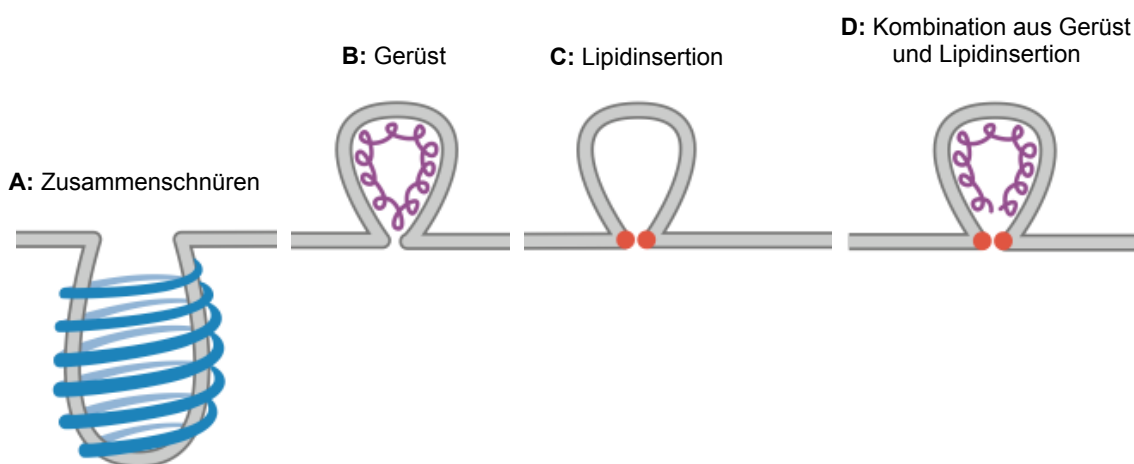


Abb. 6: Mechanismen der Membranabspaltung. **A:** Proteinringe können sich von außen an ein knospendes Vesikel anlagern und soweit zusammenziehen, dass eine Abspaltung erfolgt (z.B. Dynamamin bei der Endocytose). **B:** Die Zusammenlagerung eines Gerüstproteins an der inneren Vesikelmembran kann die Membran ausreichend deformieren, um eine spontane Spaltung herbeizuführen (z.B. Bestandteile des ESCRT-Komplexes bei der Bildung zellulärer Transportvesikel oder Matrixprotein M1 bei der Knospung von Influenzaviren). **C:** Eine Proteininsektion in das innere Membranblatt (z.B. der M2-AH von Influenzaviren) oder in das äußere Membranblatt (z.B. bei Proteinen zellulärer Transportprozesse) kann über eine Änderung der Membrankrümmung und/oder Linienspannung die Knospung und Abspaltung herbeiführen. **D:** Es wird vermutet, dass *in vivo* eine konzertierte Aktion von inserierenden und Gerüstproteinen vonnöten ist. Modifiziert nach Ref. 80.

1.2.7 Kräfte der Knospung von Influenzavirus A

Um zu ermitteln, welche viralen Proteine für die Knospung verantwortlich sind, kann man einzelne Proteine individuell in Zellen exprimieren und untersuchen, ob virusähnliche, nicht-infektiöse Partikel (VLP, *virus like particles*) freigesetzt werden. Viele virale Proteine können *in vitro* ohne zusätzliche Faktoren eine Knospung der Membran bewirken^{69,162–165}. *In vivo* sind allerdings weitere Proteine nötig, die schrittweise den Prozess der Knospung bis hin zur Abschnürung, welche *in vivo* oft eine zusätzliche Kraft benötigt, bewirken^{80,158}.

In vitro VLP-Experimente ergaben, dass einzeln exprimiertes HA¹⁶², NA¹⁶⁶, M2^{69,162} oder artifiziell zur Membran gebrachtes M1^{164,167} in der Lage sind, eine Knospung zu initiieren, aber auch, dass die Expression aller Proteine gemeinsam zur effektivsten VLP-Produktion führt^{55,162}. *In vivo* ist die Situation komplexer. So kann HA im Zuge der viralen Infektion zwar die Knospung initiieren, jedoch nicht bis zur Abschnürung fortführen. M2 hingegen kann die Knospung nicht initiieren, was auch aufgrund seiner verzögerten Expression nicht möglich wäre¹⁶⁸, aber beenden (s. Ref. 55 und Referenzen darin). Eine Theorie ist, dass zur Membran rekrutiertes M1, welches mit dem C-Terminus von HA interagiert, die Fähigkeit des HA unterbindet, das Knospen zu terminieren und M1 wiederum weitere Proteine z.B. M2 rekrutiert, die dann die finale Abspaltung bewerkstelligen⁵⁵.

Insgesamt ist die Assemblierung und Knospung von Influenzaviren ein robuster und teilweise redundanter Prozess, der durch die kooperative Funktion verschiedener Proteine und Faktoren erfolgt. Dies bietet die Möglichkeit der Regulation, und stellt sicher, dass eine korrekte Assemblierung der viralen Komponenten vor der Abknospung stattgefunden hat^{55,58}. Der exakte Mechanismus und auch die Hauptkraft, die die Änderung der Membrankrümmung während der Knospung bewirkt, sind bis heute unklar. Abb. 7 fasst die möglichen, zur Knospung von Influenzaviren beitragenden Kräfte zusammen. Stachowiak *et al.*¹⁶⁹ zeigten, dass hohe lokale Proteinkonzentrationen eine Membrankrümmung und Tubulation erzeugen können. So könnte bereits die lokale Akkumulation der Proteine NA und HA (mit ihren großen Ektodomänen) zu Beginn der Knospung die Krümmung der Membran initiieren. Auch die große, stabilisierte Raft-Domäne trägt vermutlich über ihren erhöhten Cholesterolgehalt und die Linienspannung an der Phasengrenze zur Knospung bei¹³¹ (vgl. Kap. 1.2.4). Des Weiteren könnte das oligomerisierende Matrixprotein M1 als Gerüst wirken, welches die Membran nach außen drückt⁶⁴ und sowohl das Cytoskelett⁵⁸ als auch die ankommenden vRNPs könnten diesen Prozess unterstützen⁴¹. Im letzten Schritt, der finalen Abschnürung von der Wirtszelle, spielt vermutlich das M2-Protein eine essenzielle Rolle (vgl. Abb. 7). Das effiziente Knospen von

Influenzaviren scheint somit das Resultat einer kombinierten Aktion von Gerüstproteinen, Keilininsertion und domäneninduziertem Knospen zu sein⁵⁸.

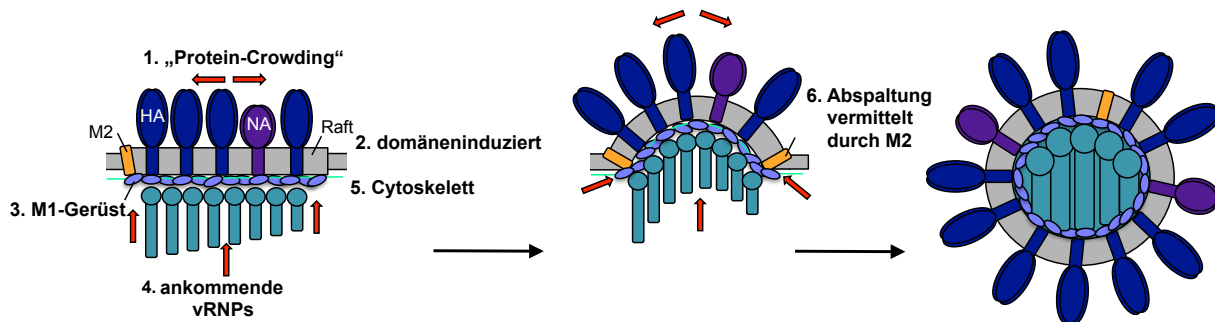


Abb. 7: Kräfte der Knospung von Influenzaviren. Die Knospung von Influenzaviren erfolgt durch die additiven Kräfte verschiedener Proteine und Faktoren. Die Akkumulation der Proteine NA und HA mit ihren großen Ektodomänen könnte die Krümmung der Membran initiieren (1.). Rafts fördern über die Höhenunterschiede zur angrenzenden Nicht-Raft-Region und die resultierende Linienspannung die Krümmungsbildung (2.). M1 (3.), ankommende vRNPs (4.) und auch das Cytoskelett (5.) könnten die Membran nach außen drücken. Die finale Abspaltung wird vermutlich durch das Protein M2 vermittelt (6.)

Folgend werden die beiden Influenzavirusproteine HA und M2 ausführlich vorgestellt.

1.3 Hämagglutinin

1.3.1 Struktur und Funktion

Das Glykoprotein HA ist neben NA das Haupthüllprotein (und Oberflächenantigen) von Influenzaviren und für die Anheftung an die Wirtszelle verantwortlich. HA ist ein Typ I Transmembranprotein, mit einem Amino (N)-terminalen Signalpeptid, welches im ER abgespalten wird, einer großen, glykosylierten Ektodomäne, einer TMD (26-27 Aminosäuren (As)) und einem kurzen CP-Bereich (10-11 As)^{170,171} (Abb. 8A und B). Während die Kristallstruktur der Ektodomäne vieler HA-Subtypen bekannt ist und neben der Aminosäuresequenz zur Einteilung der 18 HA-Subtypen in zwei evolutionäre HA-Gruppen genutzt wird¹⁷, ist über die Struktur des restlichen Proteins wenig bekannt.

HA ist ein Homotrimer, wobei jedes Monomer aus zwei Untereinheiten, HA1 und HA2, besteht. Diese liegen zunächst auf einer Polypeptidkette (HA0), s. Abb. 8A. Die Verankerung in der Membran erfolgt über die TMD des HA2, das HA1 formt den globulären Kopfbereich (stabilisiert durch Disulfidbrücken), der die Sialinsäure-Bindetasche enthält (vgl. Abb. 8B). Die Aktivität von Wirtspeptidasen generiert aus HA0 die aktivierbare Form des HA, mit dem für Fusionsproteine charakteristischen metastabilen Zustand¹⁷². In diesem sind HA1 und HA2 nur noch über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Abb. 8A). Auch wenn Influenzaviren, bedingt durch die Interaktion von HA mit der auf Zelloberflächen weit verbreitet vor-

kommenden Sialinsäure, viele Zelltypen infizieren können, so legt die benötigte Prozessierung des HA0 fest, welche Zelltypen und Gewebe letztendlich infektiöse Nachkommenviren generieren können¹⁷³. Die Prozessierungsspaltstellen aller humanpathogener Influenzaviren sind monobasisch (-R-) und werden durch extrazelluläre Proteasen erkannt, die nur im Respirationstrakt des Menschen vorkommen, weshalb sich die Infektion auf diesen beschränkt. In einigen aviären Subtypen (H5 und H7) liegt eine polybasische Spaltstelle mit mehreren Argininen (R-X-K/R-R-Motiv) vor. Diese wird durch Proteasen erkannt, die im Golgi-System fast aller Zelltypen vorkommen¹⁷⁴. Diese Stämme können daher eine systemische Infektion hervorrufen und sind hochpathogen¹⁷⁵.

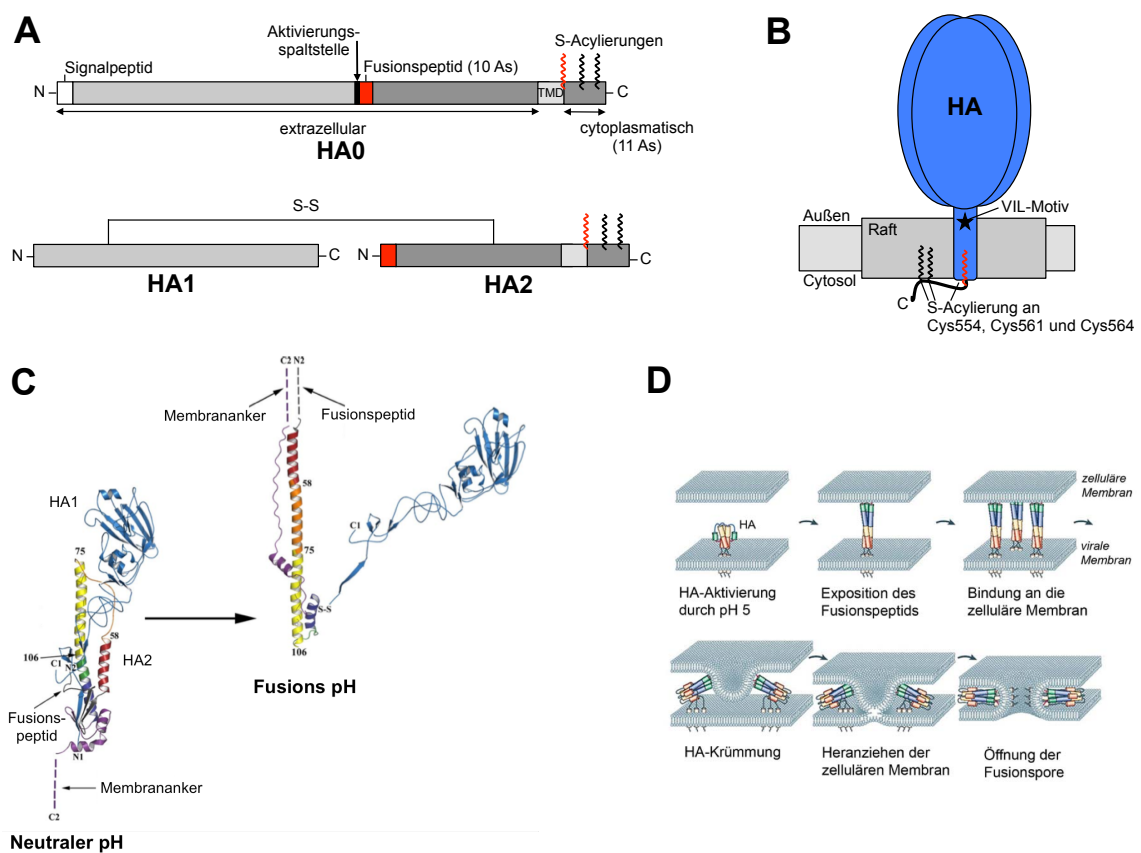


Abb. 8: HA: Struktur und Modell der Membranfusion. **A:** HA wird mit Signalpeptid (weiß) als Vorläufer HA0 synthetisiert. Ein Monomer ist etwa 560 As lang. Zelluläre Proteasen generieren durch Spaltung die Untereinheiten HA1 und HA2, die durch eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Das Fusionspeptid (rot) ist am N-Terminus von HA2 lokalisiert. TMD-Transmembrandomäne; gewellte Linien: S-Acylierung (schwarz-Palmitat, rot-Stearat) **B:** Schematische Darstellung des HA-Trimers. Die Raft-Assoziationssignale des HA sind hervorgehoben: VIL-Motiv (Stern) sowie drei S-Acylierungen (gewellte Linien) **C:** Struktur der Ektodomäne eines HA-Monomers bei neutralem und saurem (Fusions-) pH. N- und C-Termini des globulären HA1 (blau) sind mit N1, C1 bzw. des fibrösen HA2 (mehrfarbig) mit N2, C2 markiert. Ein Vergleich der zwei Strukturen zeigt, dass die membrandistalen HA1-Domänen beim Fusions-pH detrimersieren. Das Fusions-pH detrimersieren. Das Fusionspeptid am N-Terminus von HA2 (grau) wird umorientiert und zum N-Terminus einer neuen 100 Å langen α -Helix, die eine dreifach helikale „coiled-coil“ Struktur bildet. Das Fusionspeptid wird oben auf dem HA-Monomer exponiert. Modifiziert nach Russell *et al.*¹⁷⁶. **D:** In der Prefusionskonformation ist das Fusionspeptid im HA-Trimer verborgen. Die Reduktion des pH-Wertes löst eine Konformationsänderung im HA-Trimer aus, das Fusionspeptid inseriert in die endosomale Membran. Durch das Zusammenziehen des HA werden beide Membranen einander noch näher gebracht. Über ein instabiles Hemifusions-Zwischenprodukt wird schließlich die Fusionspore gebildet, durch die das virale Genom in das Cytoplasma der Wirtszelle gelangt. Modifiziert nach Earp *et al.*¹⁷⁷.

Das hydrophobe Fusionspeptid am N-Terminus des HA2 (vgl. Abb. 8A) ist bei neutralem pH im HA-Trimer verborgen und nahe der viralen Membran lokalisiert. Nach der Aufnahme des Virus in die Wirtszelle werden die globulären HA1-Untereinheiten beim sauren pH des Endosomens protoniert. Die positive Ladung führt zu ihrer gegenseitigen Abstoßung und einer Entfernung von den HA2-Untereinheiten¹⁷⁸ (Abb. 8C und D). Die Loop-Strukturen (jedes Monomers), die mit dem Fusionspeptid verbunden sind, gehen in die für Typ I Fusionsproteine charakteristische „*coiled-coil*“ Struktur über. Das Fusionspeptid ist nun auf der Oberfläche exponiert und interagiert mit der Wirtszellmembran¹²⁴. In einer zweiten Konformationsänderung krümmt sich das gesamte HA-Molekül zusammen und bringt dadurch virale und endosomale Membran noch dichter zueinander, so dass das Fusionspeptid in die endosomale Membran inserieren kann (Abb. 8D). Ein als Hemifusion bezeichneter Zwischenschritt, in dem nur die jeweils äußeren Membranblätter der fusionierenden Membranen miteinander verbunden sind, entsteht. Durch eine Konformationsänderung der TMD wird Stress im Hemifusions-Membranbereich generiert, die Fusion der inneren Membranblätter und somit die Bildung der Fusionspore löst diese Spannung^{179,180}. Das virale Erbgut gelangt in das Cytoplasma der Wirtszelle^{171,177}.

1.3.2 Raft-Assoziation

Nach seiner Synthese, Faltung und Trimerisierung im ER, sowie Glykosylierung und S-Acylierung (im ER und Golgi-Apparat), wird HA über den sekretorischen Weg zur apikalen Plasmamembran der Wirtsepithelzelle gebracht, dem Ort der Virusknospung^{58,114,181}. Die Assemblierung neuer Influenzaviren erfolgt an Rafts (Kap. 1.2.1), wobei HA für den initialen Schritt der Bildung großer stabilisierter Raft-Domänen als Knospungsplattform verantwortlich ist⁵⁵. Die Raft-Assoziation des HA erfolgt über seine S-Acylierungen (Kap. 1.2.2) an typischerweise drei Cysteinen^{182,183} und die hydrophoben Aminosäuren Val-Ile-Leu (VIL) im nach außen gerichteten Bereich der TMD^{59,120} (Abb. 8B).

HA ist ein hoch variables Protein mit einer sehr geringen Sequenzhomologie zwischen den verschiedenen Subtypen ($\approx 20\%$)¹⁰⁴. Ein Vergleich aller HA-Sequenzen (≈ 17.000) der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) Datenbank zeigt aber, dass der CP-Bereich stark konserviert ist und dass jedes HA mindestens drei, der HA-Subtyp H11 sogar vier, Cysteine besitzt, die stöchiometrisch acyliert werden. Cysteine im CP-Bereich sind mit Palmitat (C 16:0) und solche im zum Cytosol gerichteten Ende der TMD (abhängig vom Wirtszelltyp und Virusstamm) mit 30-100 % Stearat (C 18:0) modifiziert^{108,109,182}. Die Position des äußersten Cysteins im C-Terminus ist streng konserviert, die Position der anderen Cysteine ist in

verschiedenen Subtypen manchmal um eine oder wenige Aminosäuren verschoben, aber innerhalb der Subtypen selbst streng konserviert¹⁰⁴.

Zahlreiche Studien zur Bedeutung der Acylierungen in Influenzaviren wurden bereits durchgeführt, konnten diese jedoch bis heute nicht gänzlich klären. Mittels FRET konnte gezeigt werden, dass HA abhängig von seinen Raft-Assoziationsmotiven mit dem doppeltacylierten Raft-Marker des inneren cytosolischen Membranblattes (Myr-Pal-YFP) clustert (vgl. Abb. 9), das VIL-Motiv und die Acylierung jedoch nicht additiv wirken¹⁸⁴. Weiterhin führte die Deletion der Raft-Assoziationsmotive zu einer moderat erhöhten Diffusion von HA, diese war jedoch im Wildtyp (Wt), als auch in den Mutanten langsamer, als die Diffusion des Raft-Markers selbst. Das zeigt, dass sie nicht gemeinsam (in einem stabilen Raft-Komplex) diffundieren und stützt somit die Hypothese, dass die Interaktion von HA mit Rafts stark dynamisch ist und im Zuge der Knospung vermutlich eine Stabilisierung, möglicherweise vermittelt durch das Matrixprotein M1, nötig ist^{94,184,185}. Des Weiteren ist das Cytoskelett für das Clustern von HA mit dem Raft-Marker nötig (Abb. 9A)⁹⁴. HA mit Mutationen im VIL-Motiv ist dispers an der Plasmamembran verteilt, was seine Inkorporation in Viruspartikel, die Knospungseffizienz und auch die Membranfusion beeinträchtigt⁵⁹. Des Weiteren ist der intrazelluläre Transport verzögert¹²². Eine aktuelle Studie an einem Gruppe 2-HA liefert Hinweise darauf, dass die Aminosäure Leucin (Leu532) des VIL-Motivs zusammen mit weiteren Aminosäuren (Tyr527, Lys528 im Linker und Try533 zu Beginn der TMD) möglicherweise Bestandteil eines konservierten Cholesterol-Bindemotivs ist, welches die Wechselwirkung mit Rafts und auch den intrazellulären Transport durch den Golgi-Apparat und darüber hinaus, erleichtert¹⁰³.

Die Herstellung rekombinanter Viren mit Mutation im VIL-Motiv (HA-VIL3A) ist möglich; die Viren wachsen mit einem gegenüber dem Wildtyp um 2-4 log-Stufen reduzierten Titer⁵⁹. Dramatischere Effekte erhält man durch eine Deletion der Acylierungsstellen des HA. So war die Herstellung rekombinanter Influenzaviren in denen zwei oder drei Acylierungsstellen des HA fehlen, bisher nicht möglich^{186,187}, was darauf hindeutet, dass diese Modifikation essenziell für das Wachstum der Viren ist. Viren mit unteracyliertem HA zeigten ein stark vermindertes Wachstum in der Zellkultur. Der Titer war um etwa einen log reduziert, wenn das Stearat am Ende der TMD fehlte. Bedeutend stärker (3-5 Titerstufen Reduktion) war der Effekt, wenn die palmitoylierten cytoplasmatischen Cysteine substituiert wurden^{186,187}. Überraschenderweise wuchsen Acylierungsmutanten des Stammes Udorn besser (oder konnten überhaupt erst generiert werden), wenn andere virale Proteine, insbesondere M1 vom WSN-Stamm, bereitgestellt wurden. Allerdings unterscheiden sich die M1-Proteine beider Stämme

nur in sechs Aminosäuren und es konnte bisher auch keine M1-Bindestelle im HA identifiziert werden¹⁸⁷, so dass die molekulare Grundlage für diesen Effekt unklar ist. Abhängig vom HA-Subtyp zeigten die Acylierungsmutanten entweder einen Defekt bei der Knospung^{55,187} oder bei der HA-vermittelten Membranfusion^{183,186,188–190}, der ebenfalls stärker ausgeprägt war, wenn die cytoplasmatischen Palmitoylierungen substituiert wurden. So zeigten unteracylierte HA-Mutanten vom H1, H7 und eines H2 Subtyps, als auch von Influenza-B-Viren eine starke Beeinträchtigung bei der Bildung und Stabilisierung der Fusionspore oder bei der Synzytium Bildung^{183,186,189,190}. Im Gegensatz dazu vermittelten der unteracylierte H3- und ein anderer H2-Subtyp die komplette Fusion, wiesen aber Defekte beim Zusammenbau und der Knospung auf, die sich in einer Reduktion der in Viruspartikel inkorporierten NP- und M1-Menge niederschlugen^{187,191}. Die Ursache dafür, dass sowohl die Fusion, als auch die Knospung beeinträchtigt sind, könnte in der reduzierten Raft-Assoziation des mutierten HA begründet sein, da eine Konzentration des HA, die durch die Raft-Assoziation erreicht wird, für beide Prozesse von Bedeutung ist¹⁰⁹ (s. auch Kap. 1.2.3).

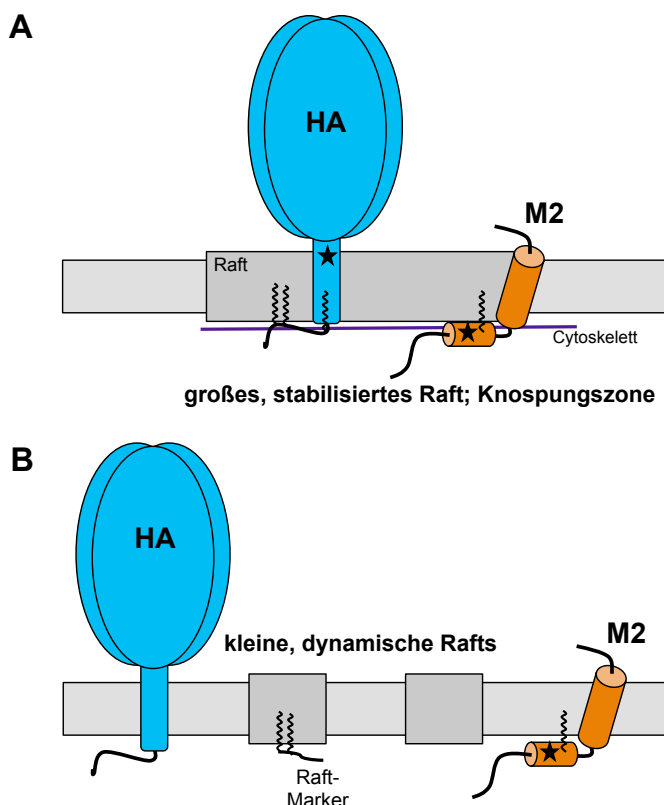


Abb. 9: Raft-Assoziation von HA und M2.

A: HA ist, bedingt durch die sehr hydrophoben As in der TMD (Stern) und die C-terminalen S-Acylierungen (gewellte Linien), in Membran-Rafts lokalisiert und bildet größere, stabilere Raft-Domänen aus, mit denen (nicht aber mit kleinen dynamischen Rafts) auch M2 interagieren kann. M2 ist vermutlich am Rand der Knospungszone lokalisiert und besitzt zwei potenzielle Raft-Signale: CRAC-Motive (Stern) und eine S-Acylierung (gewellte Linie). Kortikales Aktin (lila Linie) wird für das Clustern von HA mit Rafts und für die Assoziation von M2 mit HA benötigt. **B:** Die Zerstörung der Raft-Motive des HA führt zu dessen zufälliger Verteilung an der Plasmamembran. Es clustert weder mit dem Marker für kleine, unstimulierte Rafts noch mit M2.

1.4 Protein M2

1.4.1 Struktur und Funktion

Das Protein M2 des Influenzavirus A ist (neben HA und NA) das dritte integrale Membranprotein, welches einerseits als Protonenkanal für den Viruseintritt^{192,193} und andererseits für die Knospung der Viren von Bedeutung ist⁵⁵. Zusammen mit M1 wird M2 durch Segment sieben des Genoms kodiert, wobei die M2-mRNA durch alternatives Spleißen entsteht^{194,195}. Jedes M2-Monomer umfasst 97 Aminosäuren und ist untergliedert in eine N-terminale Ektodomäne (24 As), gefolgt von einer α -helikalen TMD (19 As) und einem langen CP-Bereich (54 As), der eine amphiphile Helix beinhaltet^{168,196} (Abb. 10A).

M2 oligomerisiert in ein Homotetramer (Abb. 10B), das durch intermolekulare Disulfidbindungen der Ektodomänen stabilisiert wird und dessen transmembrane Helices einen säureaktivierten Protonenkanal bilden¹⁹². Die Histidin-Tetrade des charakteristischen Signaturmotivs His37xxxTry41 ist für die Säureaktivierung, die Protonenselektivität und den Protonentransport verantwortlich^{193,197}. Prinzipiell genügt die TMD für den Protonentransport, allerdings wirkt der angrenzende CP-Bereich stabilisierend, so dass die maximale Protonenleitfähigkeit durch ein Peptid, welches die Aminosäuren 22-62 (also auch die AH) umfasst, erreicht wird¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Liao *et al.*²⁰¹ fanden kürzlich Hinweise dafür, dass die negative Nettoladung des C-Terminus die Protonierung des His37 begünstigen könnte und möglicherweise auch die elektrostatische Abstoßung der vier C-Termini eines Tetramers die Rückgratkonformation der TMD-Helices verändert und so zu einem weiter geöffneten Kanal führt. In der Medizin kommen Substanzen wie Amantadin und Rimantadin zum Einsatz, die die Protonenkanalaktivität durch Bindung an Ser31 inhibieren, vermutlich indem sie den Kanal blockieren²⁰⁵.

In den letzten Jahren wurde sowohl per Röntgenstrukturanalyse als auch Lösungs- und Festkörper-Nuklear-Magnetresonanz (NMR) die Konformation der TMD-Helices mit oder ohne gebundenen Inhibitor²⁰⁴⁻²⁰⁶ und auch teilweise der AH^{201,208,209} determiniert. Ein eng gebogener Bereich aus etwa drei Aminosäuren verbindet die TMD mit der cytoplasmatischen AH. Diese ist parallel zur Membran orientiert, in die ihr hydrophober Anteil teilweise inseriert ist (vgl. Abb. 10 A und B)^{196,200,209,210}. Wenig ist über die Konformation des N-terminalen und restlichen C-terminalen Bereiches bekannt. Die Auswertung der zahlreichen bisherigen M2-Strukturanalysen lässt den Schluss zu, dass die Membrenumgebung die Konformation des M2-Proteins wesentlich beeinflusst¹⁹⁶. In einer Studie des kompletten M2-Proteins fanden Liao *et al.*²¹¹ konkrete Hinweise, dass sich die M2-Struktur, besonders der Ektodomäne und des CP-Bereichs, in Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung und speziell des Cho-

TMD jedoch eine komplette Raft-Assoziation verhindert, so dass M2 an der Raft-Peripherie akkumuliert. Im Einklang mit dieser Raft-Ausschluss Theorie steht, dass sich in Viren nur geringe Mengen M2 befinden (14-68 M2-Moleküle pro Virus), obwohl es genauso stark exprimiert an der Oberfläche von infizierten Zellen vorliegt wie HA und NA^{57,168,219}. Des Weiteren konnte per Immunelektronenmikroskopie gezeigt werden, dass M2 an der Basis wachsender, filamentöser Viren lokalisiert ist, wo es der postulierten Rolle beim Abschnüren der ausgereiften Viruspartikel gerecht werden könnte⁶⁹. Im Einklang mit dem von Schroeder *et al.*²¹⁵ aufgestellten Modell konnte ferner gezeigt werden, dass ein gereinigtes Peptid des CP-M2-Bereiches (*in vitro* und in Zellen) an Membranen bindet, wobei die Acylierung und die CRAC-Motive diese Assoziation modulieren. Darüber hinaus sind die CRAC-Motive für die Cholesterolbindung dieses Peptids von Bedeutung²¹⁸. Per FRET konnte gezeigt werden, dass individuell exprimiertes M2 keine Raft-Lokalisation aufweist (und nicht mit dem Raft-Marker des inneren cytosolischen Membranblattes interagiert), bei zusätzlicher Expression des HA-Proteins jedoch eine Affinität für die durch HA gebildeten größeren, stabilisierten Raft-Domänen besitzt²¹⁷ (vgl. Abb. 9). Experimente mit GFP-markiertem M2 in GPMVs (ein aus Zellen generiertes Modellmembransystem, in dem das Cytoskelett und cytoplasmatische Proteine fehlen) zeigten weiterhin, dass M2 befähigt ist, mit stabilisierten Raft-Domänen zu interagieren und dass dafür die Acylierung, nicht aber die CRAC-Motive wichtig sind²¹⁸. Überraschenderweise hatten jedoch weder Mutationen der Acylierungsstelle noch der CRAC-Motive (vgl. Abb. 10C), einzeln oder in Kombination, einen signifikanten Einfluss auf das Viruswachstum in Zellkultur^{68,216,220–222}. Im Mausmodell beeinträchtigten diese Mutationen nur leicht die Virulenz und Pathogenität der Viren^{220,222}.

Die Literatur der letzten Jahre liefert Hinweise, dass die **amphiphile Helix** für den effizienten Zusammenbau neuer, besonders filamentöser Viren, die Knospung und die finale Abspaltung von der Wirtszelle von großer Bedeutung ist. Ein aktuelles Modell sieht die Abschnürung als Resultat der modifizierten Membrankrümmung und Lipid-Phasensegregation nach Insertion der AH (Übersicht in Refs. 55, 80 und 223) und misst zudem der Membran-Cholesterolkonzentration eine regulatorische Bedeutung bei. In der cholesterolreichen Umgebung der Knospungszone kann die Helix demnach zunächst vermutlich nicht so tief in die Membran inserieren und folglich keine starke Krümmung generieren^{69,211}, was eine vorzeitige Abspaltung von der Plasmamembran der Wirtszelle verhindert. Stattdessen würde die neu gebildete Knospe zunächst stabilisiert und so die Zusammenlagerung aller viralen Komponenten ermöglicht. M2 würde dann an die Raft-Peripherie verlagert und wäre somit am Hals der

knospenden Viren lokalisiert^{69,224}. Die relativ kurze TMD des M2 könnte diese Lokalisation begünstigen²¹⁵. Die geringe Cholesterolkonzentration der L_d-Phase und/oder die starke Krümmung am Hals der knospenden Viren könnten schließlich dazu führen, dass die AH tief in die Membran inseriert und bei entsprechend hoher lokaler M2-Konzentration über eine Erhöhung der Linienspannung zwischen L_d- und L_o-Phase, oder direkt über einen erzeugten Lipidpackungsdefekt, eine negative Krümmung am Virushals herbeiführt^{69,126}. Unterschreitet der Durchmesser des Halses einen kritischen Schwellenwert von 10 nm würde die spontane Abspaltung erfolgen⁶⁹. Passend dazu zeigten Rossman *et al.*⁶⁹ per Immunfluoreszenzmikroskopie, dass das M2-Protein und ein Peptid der AH, die Fähigkeit besitzen, eine Membrankrümmung, Vesikelbildung und -abspaltung in GUVs zu bewirken. Ein fluoreszenzmarkiertes Peptid der AH assoziierte in phasenseparierten GUVs mit der L_d-Phase, an der Grenze zur L_o-Phase, deren Vesikulation es vermittelte. Studien, in denen einzelne⁶⁸ oder jeweils drei benachbarte²²⁵ As der Helix durch Alanin substituiert wurden, ergaben, dass dieser Bereich zahlreiche Substitutionen toleriert, ohne signifikante Effekte auf die Virusreplikation zu haben. Im Gegensatz dazu zeigten Viren, in denen zwei oder bis zu fünf konservierte, hydrophobe Aminosäuren (F47, F48, I51, Y52, F55) der M2-Helix durch Alanin ersetzt wurden (Abb. 10C), was zu einer mitunter starken Reduktion des hydrophoben Moments (und somit der Helix-Amphiphilität) führte, ein reduziertes Wachstum in der Zellkultur und bildeten vermehrt sphärische statt filamentöse Udorn-Viruspartikel^{68,224}. Des Weiteren waren Mutanten oder Helixpeptide mit diesen Mutationen nicht mehr zur Krümmungsinduktion und Vesikelbildung in GUVs in der Lage. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit den Mutanten infizierten Zellen zeigten die typische „Perlenketten“-Morphologie, ein Hinweis auf einen Defekt in der finalen Abspaltung, und eine diffusere Verteilung des Proteins, anstatt einer definierten Lokalisation an der Raft-Peripherie^{69,224}.

Die Aufklärung der Rolle von M2 bei der viralen Knospung und speziell die Bedeutung der amphiphilen Helix und der Acylierung und CRAC-Motive in ihr, ist Schwerpunkt der aktuellen Forschung und steht auch im Mittelpunkt dieser Arbeit.

1.5 Zielsetzungen

Die Assemblierung und Knospung von Influenzaviren erfolgt an cholesterol- und sphingolipidreichen Regionen (Rafts) der apikalen Wirtszellmembran, zu der alle viralen Komponenten transportiert werden. Das Protein HA organisiert die Plattform für die Assemblierung, indem es, vermittelt durch seine Raft-Lokalisationssignale (kovalent gebundene Fettsäuren im C-

Terminus (Acylierungen) und hydrophobe Aminosäuren zu Beginn der Transmembrandomäne), stabile Raft-Domänen bildet. Das Protonenkanalprotein M2 kann mit diesen Raft-Domänen, nicht aber mit den kleinen dynamischen Rafts per se, interagieren. Der amphiphilen Helix in seinem C-terminalen Bereich, die ebenfalls zwei potenzielle Raft-Lokalisierungsmotive, eine Acylierung und Cholesterol-Bindemotive (CRAC), enthält, wird eine essenzielle Bedeutung bei der Knospung zugeschrieben.

Die intrinsischen Signale, aufgrund derer M2 zur apikalen Plasmamembran transportiert wird, wurden noch nicht identifiziert. Basierend auf dem Modell des apikalen Transports, welches die Vermittlung durch Raft-ähnliche Vesikel beinhaltet, war es vorstellbar, dass die potenziellen Raft-Lokalisierungssignale von M2 dafür von Bedeutung sind. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit als Erstes überprüft werden. Des Weiteren sollte per FLIM-FRET-Messungen untersucht werden, ob diese Signale, wie postuliert, für die Interaktion mit den durch HA gebildeten stabilen Raft-Domänen benötigt werden.

Anschließend sollte der Frage nachgegangen werden, wie sich eine Deletion der postulierten Raft-Lokalisierungssignale von M2 und HA, einzeln und gemeinsam, auf die Virusvermehrung in Zellkultur auswirkt. Die Frage nach einer möglichen Synergie ergab sich aus der Tatsache, dass in vorherigen Studien M2-Acylierungs- (als auch CRAC-Motiv-) Mutanten in der Zellkultur keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen, obwohl dies *in vitro* der Fall war. Da die Knospung von Influenzaviren ein komplexer, teilweise redundanter Prozess und HA neben M2 das einzige acylierte Protein in Influenzaviren ist, könnten die durch eine fehlende Acylierung (oder CRAC-Motive) im M2 bewirkten Effekte durch Wildtyp-HA kompensiert werden.

In einem letzten Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die Rolle der cytoplasmatischen amphiphilen M2-Helix untersucht werden. Für sie wurde postuliert, dass sie der Lokalisation des M2 am stark gekrümmten Hals knospender Viren und der finalen Abschnürung von der Wirtszelle dient. Frühere Arbeiten führten zur Annahme, dass Amphiphilität und Gesamtstruktur der Helix wichtiger sind als die spezifische Proteinsequenz. Daher sollte im viralen Kontext getestet werden, ob die Helix durch typische krümmungsdetektierende oder -modulierende Helices ersetzt werden kann. Dies würde Rückschlüsse auf die Bedeutung der Sequenz, der Amphiphilität und der Fähigkeit der Helix eine Membrankrümmung zu detektieren und/oder zu induzieren, zulassen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Eukaryotische Zelllinien:

- **CHO-K1:** *Chinese hamster ovary cells*, Zelllinie aus dem Ovar eines chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*), ATCC CCL-61
- **MDCKII:** *Madin–Darby canine kidney cells*, Zelllinie aus dem Nierenepithel eines Hundes, ATCC CCL-34
- **HEK-293T:** *human embryonic kidney-293T cells*, Zelllinie aus dem Nierenepithel eines menschlichen Embryos, ATCC CRL-1573

Prokaryotische Zellen:

- ***E. coli* XL1-Blue** (Stratagene), Wirtstamm für Klonierungen, Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^q ZAM15Tn10* (Tet^r)]
- ***dam⁻/dcm⁻* chemisch kompetente *E. coli* K12** (NEB), Methyltransferase defizienter chemisch kompetenter *E. coli* Stamm, geeignet für die Synthese und folgende Präparation von Plasmiden ohne Dam und Dcm Methylierung. Genotyp: *ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) Tet^S endA1 rspL136 (Str^R) dam13::Tn9 (Cam^R) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2*

2.1.2 Plasmide, Oligonukleotide, Peptide und Proteinsequenzen

2.1.2.1 Plasmide aus vorherigen Studien

In Tab. 1 sind die für diese Arbeit relevanten Plasmide vorheriger Studien, ihre charakteristischen Eigenschaften und die Herkunft angegeben.

Konstrukt	Relevante Eigenschaft	Quelle
Plasmide für reverse Genetik (Amp^r)		
pHW2000-PB2, -PB1, -PA, -HA, -NP, -NA, -M, oder -NS	cDNA von Influenza A/WSN/1933 Segment 1-8 in pHW2000 ²²⁶	T. Wolff (Robert Koch-Institut, Berlin)
pHW2000-M_M2-mut (mut = C50S und/oder Y52S, Y57S)	ersetzte Palmitoylierungsstelle (C50S) und/oder unterbrochene Cholesterol-Bindemotive (Y52S, Y57S) im M2-ORF (WSN)	Thaa <i>et al.</i> , 2012 ²¹⁶
pHW2000-HA-mut (mut = Ac1, Ac2 oder Ac3)	nicht-acyliertes HA (WSN) weist an den Positionen 554, 561 oder 564 ein Serin, anstelle eines Cysteins auf.	B. Thaa
Plasmide für Expression fluoreszenzmarkierter Proteine in Säugetierzellen^a (Kan^r)		
pHA-mCer-wt	HA von Influenza A/FPV/Rostock/1/1934 am C-Terminus über Linker PRARDPPVAT fusioniert an Cer, mit Mutation R339G ^b	Engel <i>et al.</i> , 2010 ¹⁸⁴

Konstrukt	Relevante Eigenschaft	Quelle
pHA-mCer-AcI	an Position 551 nicht-acyliertes HA (FPV) besitzt dort ein Serin, anstelle eines Cysteins	B. Thaa
pHA-mCer-mut (mut = C3S und/oder VIL3A)	mutierte Acylierungsstellen (C551S, C559S und C562S) und/oder Substitution der Aminosäuren VIL (Position 527-529) des HA (FPV) durch Alanin	Engel <i>et al.</i> ¹⁸⁴
pM2-YFP/-RFP/-GFP	M2 von Influenza A/Duck/Ukraine/1/1963, C-terminal fusioniert mit YFP, RFP oder GFP	Thaa <i>et al.</i> ^{217, 218}
pM2-YFP/-GFP-mut (mut = C50S und/oder Y52S, Y57S)	Palmitoylierungs- und/oder CRAC-Motiv-Mutanten von M2 (Duck)	Thaa <i>et al.</i> ²¹⁸

Tab. 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aus vorherigen Studien. Amp^r – Ampicillin-Resistenz, Kan^r – Kanamycin-Resistenz, ^aFür die FLIM-FRET-Messung eingesetzte Konstrukte tragen die Mutation A206K im fluoreszierenden Protein (Cer, YFP), wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Oligomerisierung des Fluorophors minimiert wird²²⁷. ^bMutation der polybasischen Schnittstelle zu einer monobasischen, um die Spaltung von HA in seine Untereinheiten HA1 und HA2 bereits im trans-Golgi Netzwerk zu unterbinden²²⁸.

2.1.2.2 In dieser Arbeit generierte Plasmide und dafür verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit generierten Konstrukte, ihre relevanten Eigenschaften sowie die zur Erstellung eingesetzten Oligonukleotide sind in Tab. 2 genannt; die Sequenz der Oligonukleotide zeigt Tab. 3. Die Proteinsequenzen von M2 und HA sind in Kap. 2.1.2.5 aufgeführt. Die Plasmide zur Erzeugung rekombinanter Influenzaviren mit zweifach nicht-acyliertem HA sowie die M2-Stopp-Mutante wurden per inverser PCR (Kap. 2.2.1.8) generiert. Für jede Mutation wurden mindestens zwei Nukleotide im betreffenden Aminosäurekodon ausgetauscht, um eine Reversion zur Wildtypsequenz zu erschweren. Um die Plasmide für die Herstellung von Influenza WSN-Viren mit Mutationen in der amphiphilen Helix von M2 zu generieren, wurde ein synthetisches Genfragment, in dem die M2-Helix deletiert war, mit den Restriktionsendonukleasen StuI/NaeI in das Plasmid pHW2000-M inseriert und dann über die Restriktionsendonukleasen ClaI/BspEI durch Genfragmente mit modifizierter Helixsequenz ersetzt. Zur Erzeugung von Expressionsplasmiden, die für fluoreszenzmarkiertes M2 mit modifizierter amphiphiler Helix kodieren, wurde der M2-ORF (*open reading frame*, offener Leserahmen; für das Protein kodierender Bereich) von Duck (fusioniert an YFP) des Plasmids pM2-YFP durch ein synthetisches Genfragment des kompletten M2-ORF von WSN (ausgestattet mit neuen Schnittstellen, die für die weitere Klonierung benötigt wurden) zwischen den Schnittstellen SacII/AgeI substituiert. Anschließend wurde das YFP durch RFP ersetzt und so das Konstrukt pERFP-M2 WSN erhalten. Fragmente mit der entsprechenden M2-

Helixmodifikation wurden dann aus den jeweiligen pHW2000-Konstrukten ausgeschnitten und in das RFP-Konstrukt inseriert. Alle generierten Mutationen wurden durch Sequenzierung mit Standard- oder genspezifischen Primern des jeweiligen Vektors, durchgeführt durch die Firma GATC (Konstanz), bestätigt. Die dafür verwendeten Oligonukleotide zeigt Tab. 4.

Konstrukt	Derivat von	Eigenschaften	Konstruktion
pHW2000-HA-Ac1,2	pHW2000-HA-Ac1	HA: C554S, C561S	1F, 1R *
pHW2000-HA-Ac1,3	pHW2000-HA-Ac1	HA: C554S, C564S	2F, 2R *
pHW2000-HA-Ac2,3	pHW2000-HA-Ac2	HA: C561S, C564S	3F, 3R *
pHW2000-M_ M2-ΔAH	pHW2000-M-Plasmid (M von A/WSN/33)	Deletion der M2-AH neue Schnittstellen in Helixumgebung: BamHI, ClaI, BspEI	Fragment 4, Insertion <i>via</i> StuI/NaeI
			Insertion folgender Fragmente <i>via</i> ClaI/BspEI ^a :
pHW2000-M_ M2-gescrambelt WSN	pHW2000-M_ M2-ΔAH	gescrambelte M2 WSN Helixsequenz	Fragment 5
pHW2000-M_ M2-gescrambelt Udorn		gescrambelte M2 Udorn Helixsequenz	Fragment 6
pHW2000-M_ M2-ALPS		M2 mit ALPS-Helix	Fragment 7
pHW2000-M_ M2-Epsin		M2 mit Epsin-Helix	Fragment 8
pHW2000-M_ M2-RW16		M2 mit RW16 Sequenz	Fragment 9
pHW2000-M_ M2-Wt (mit ClaI/BspEI)		M2 Wt Helix	Fragment 10
pEYFP-M2 WSN	pM2-YFP (Duck)	WSN M2 C-terminal fusioniert an YFP, mit Schnittstellen BamHI, BspEI	Fragment 11, Insertion <i>via</i> SacII/AgeI
pERFP-M2 WSN	pEYFP-M2 WSN und pM2-RFP	WSN M2 C-terminal fusioniert an RFP	Austausch des YFP Fragments aus pEYFP-M2 WSN durch RFP <i>via</i> AgeI/NotI
pERFP-M2-gescrambelt WSN	pHW2000-M_ M2 Konstrukt mit der jeweiligen Mutation und pERFP-M2 WSN als Zielvektor	gescrambelte M2 WSN Helixsequenz	Insertion des Fragments zwischen BamHI/BspEI in den Zielvektor
pERFP-M2-gescrambelt Udorn		gescrambelte M2 Udorn Helixsequenz	
pERFP-M2-ALPS		M2 mit ALPS-Helix	
pERFP-M2-Epsin		M2 mit Epsin-Helix	
pERFP-M2-RW16		M2 mit RW16 Sequenz	
pHW2000-M_ M2-Stopp	pHW2000 M Plasmid von A/WSN/33	keine Synthese von funktionellem M2	12F, 12R *

Tab. 2: In dieser Arbeit generierte Konstrukte, verwendete Primer oder Gensynthesefragmente, Ausgangs- und Zielplasmide. * Diese Konstrukte wurden per inverser PCR generiert. ^a Die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease ClaI unterliegt einer Methylierung, was die Restriktion verhindert. Zur Klonierung wurde daher die Plasmid-DNA aus einem Dam⁻ *E. coli*-Stamm präpariert. AH: amphiphile Helix, Vorwärts (F)- und Rückwärts (R)-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
1F	GGTCTTTGCAGT CT AGAAATATGC
1R	GCATATTCT AG ACTGCAAAGACC
2F	GCAGTGCAGAATA AG TATCTGAGATTAGG
2R	CCTAATCTCAGAT ACT TATTCTGCACTGC
3F	GCAGT CT AGAAATA AG TATCTGAGATTAGG
3R	CCTAATCTCAGAT ACT TATTCT AG ACTGC
4	<p>AGGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGC AGCAAATATCATTGGAATCTTGCACTTGATATTGTGGATCCTTGATCGATTTTTT . . CCTTC TACCGAAGGAGTTCCGGAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGAATGCTGTGG ATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTGTTTCTACTA ATAACCCGGCGGCCCAAAATGCCGACTCGGAACGAAAGATATACCTCCCCGGGGGCCGGA GGTCGCGTCACCGACCACGCCCGCGC</p> <p>StuI-BamHI-ClaI-ΔAH(.)-BspEI-NaeI</p>
5	<p>ATCGATTATTTAAATATGGCTGCTTTCGCTATTTTATTAAACGCGGCAAACTGCGCCCTTCT ACGGAAGGAGTTCCGGA</p> <p>ClaI-gescrambeltWSN-BspEI</p>
6	<p>ATCGATCTTTAAGCTGGGCTACCTGGAGTTCAAGATCTTCCGCGGCTGCCGCCACCCTTCT ACGGAAGGAGTTCCGGA</p> <p>ClaI-gescrambeltUdorn-BspEI</p>
7	<p>ATCGATTATTTTTTCTGAACAGCGCGATGAGCAGCCTGTATAGCGGCTGGAGCAGCTTTACC ACCGGCGCGAGCAAATTTGCGAGCCCTTCTACGGAAGGAGTTCCGGA</p> <p>ClaI-ALPS-BspEI</p>
8	<p>ATCGATTATTTAGCAGCCTGCGCCGCCAGATGAAAAACATTGTGCATAACCCTTCTACGGAA GGAGTTCCGGA</p> <p>ClaI-Epsin-BspEI</p>
9	<p>ATCGATTATTTAGACGCTGGAGAAGGTGGTGGAGAAGGTGGTGGCGCAGATGGAGACGGCCT TCTACGGAAGGAGTTCCGGA</p> <p>ClaI-RW16-BspEI</p>
10	<p>ATCGATTATTTTTCAAATGCATTTATCGTCGCTTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGCCTTCT ACGGAAGGAGTTCCGGA</p> <p>ClaI-WtAH-BspEI</p>
11	<p>CGCGCCCGCGGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGC AGATGCAACGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAATATCATTGAGATCTTGCACTT GATATTGTGGATCCTTGATCGTCTTTTTTTCAAATGCATTTATCGTCGCTTTAAATACGGTT TGAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTTCCGGAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAGGAA CAGCAGAAATGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTGGAGCCACCGGT CGCGC</p> <p>SacII-BamHI-WtAH-BspEI-AgeI</p>
12F	CGATTCAAGTGAT TGATGAG TCATTGCAGC
12R	TGCAATGACT TCATCA ATCACTTGAATC

Tab. 3: Synthetische Oligonukleotide für die Herstellung der Konstrukte dieser Arbeit. Gegenüber dem Wildtyp veränderte Nukleotide sind fett gedruckt. Zur Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Kurze Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von BioTez (Berlin) bezogen. Größere Genfragmente wurden von Eurofins (Ebersberg) bezogen. Charakteristische Sequenzeigenschaften der synthetischen Genfragmente, wie neue Restriktionsschnittstellen und die Art der Modifikation der amphihilen Helix (AH) von M2 sind angegeben. F = Vorwärts- und R = Rückwärts-Primer

2.1.2.3 Weitere synthetische Oligonukleotide

Weitere synthetische Oligonukleotide dieser Arbeit und deren Verwendung zeigt Tab. 4.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
HA-ctrl_s	CGGGATTACAAACAAGG	RT-PCR HA & Sequenzierung
HA-ctrl_as	TTATATTTCTGAAATCC	
62F	ATGAGTCTTCTAACCGAGG	RT-PCR M-Segment & Sequenzierung
62R	CAAGGTAGTTTTTTACTCC	
M_F (Invitrogen)	AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG	qPCR M-Segment
M_R (Invitrogen)	TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG	
TaqMan-Sonde (Thermo F.)	6FAM-TCAGgCCCCCTCAAAGCCgA-TMR	qPCR-Sonde
M1_R	TCACTTGAATCGTTGCATCTGC	Sequenzierprimer M1
63F	GAGCAAATGGCTGGATC	Sequenzierprimer M2
HA-ctrl close (GATC)	TGGGACTTATGATTATCC	Sequenzierprimer HA
EGFP_F (GATC)	TTTAGTGAACCGTCAGATC	Sequenzierprimer für RFP-M2-Konstrukte
EGFP_R (GATC)	TAAGGGCGAAGAGCTGAT	
NA_F	ATGAATCCAAACCAGAAAATAA	Sequenzierprimer NA
NA_R	AACAACTACTTGTCAATGG	

Tab. 4: Synthetische Oligonukleotide für Sequenzierungen, RT-PCR und qPCR. Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders ausgewiesen, HPLC-gereinigt von BioTez (Berlin) bezogen. F = Vorwärts- und R = Rückwärts-Primer

2.1.2.4 Synthetische Peptide

Synthetische Peptide wurden für die CD-Spektroskopie (Kap. 2.2.35) verwendet und mit einem Reinheitsgrad von über 95 % bei der Firma pepMic (China) bestellt. Tab. 5 zeigt die Sequenzen der verwendeten Peptide.

Bezeichnung	Sequenz (N→C)
Wt-M2-Helix (WSN)	LFFKCIYRRFKYGLKRG
Gescrambelte M2-Helix (WSN)	LFKYGCFRYFIKRGKLR
Gescrambelte M2-Helix (Udorn)	FFKLGYLEFKIFRGCRH

Tab. 5: Synthetische Peptide. Die Peptide besitzen zur Stabilisierung eine N-terminale Acetylierung und eine C-terminale Amidierung.

2.1.2.5 Proteinsequenzen

Die acylierten Cysteine des HA und die amphiphile Helix von M2 sind fett hervorgehoben.

HA aus Influenza A/WSN/1933 (H1N1), 565 As:

MKAKLLVLLY AFVATDADTI CIGYHANNST DTVDTIFEKN VAVTHSVNLL EDRHNGKLCK
 LKGIAPLQLG KCNIIGWLLG NPECDSLPA RWSYIVETP NSENGACYPG DFIDYEELRE
 QLSSVSSLER EIFPKESSWP NHTFNGVTAS CSHRGKSSFY RNLLWLTKKG DSYPKLTNSY
 VNNKGKEVLV LWGVHHPSSS DEQQSLYSNG NAYVSVASSN YNRRFTPEIA ARPKVKDQHG
 RMNYYWTLL PGDTIIFEAT GNLIAPWYAF ALSRGFESGI ITSNASMHEC NTKCQTPQGS
 INSNLPFQNI HPVTIGECPK YVRSTKLRMV TGLRNIPSIQ YRGLFGAIAG FIEGGWTGMI
 DGWYGYHHQN EQGSGYAADQ KSTQNAINGI TNKVNIIIEK MNTQFTAVGK EFNMLEKRME
 NLNKKVDDGF LDIWTYNAEL LVLLENGRTL DFHDLNVKNL YEKVKSQKLN NAKEIGNGCF
 EFYHKCDNEC MESVRNGTYD YPKYSEESKL NREKIDGVKL ESMGVYQILA IYSTVASSLV
 LLVSLGAISF **WMCSNGSLQC RICI**

M2 aus Influenza A/WSN/1933 (H1N1), 97 As:

MSLLTEVETP IRNEWGCRN DSSDPLVIAA NIIIEILHLIL WILDR**LFFKC IYRRFKYGLK**
RGPSTEGVPE SMREEYRKEQ QNAVDVDDGH FVNIELE

2.1.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tab. 6 aufgelistet. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden in der Qualität *pro analysi* (p. a.) von Sigma-Aldrich oder Carl Roth bezogen.

Substanz	Hersteller
Coomassie Brilliantblau G-250	Serva
Neutralrot	Biochrom
Methanol	VWR
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 30-%; „Rotiphoese Gel30“	Roth
Essigsäure (100 %)	Roth
Magermilchpulver	AppliChem
β -Mercaptoethanol	Serva
Triton X-100	Serva

Tab. 6 Chemikalien die in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.1.4 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tab. 7 aufgelistet.

Kit	Hersteller
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
Invisorb Spin Virus RNA Mini Kit	Invitek
ExoSAP-IT for PCR Product Cleanup Kit	Affymetrix
Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	
- Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Strattec
- JETsorb Gel Extraction Kit	GENOMED
Detektionskit für Chemilumineszenz:	
- Detektion im Picogramm-Bereich: Pierce TM ECL Plus Western Blotting-Substrat	Thermo Fisher
- Detektion im Femtogramm-Bereich: SignalFire TM Elite ECL-Reagenz	NEB
DNA-Präparation	
- Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit	Invitek
- PureYield Plasmid Maxiprep Kit	Promega
Invisorb Fragment CleanUp Kit -DNA-Reinigung	Strattec
Maxima H Minus First Strand cDNA Synthese Kit	Thermo Fisher

Tab. 7: Kits die in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

2.1.5 Enzyme und molekularbiologische Reagenzien

Die Enzyme und molekularbiologischen Reagenzien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tab. 8 aufgelistet.

Substanz	Hersteller
Agar und Agarose	Invitrogen
Agarose für Plaquetests , niedrigschmelzend: SeaKem LE Agarose	Lonza/Biozym
BSA , Rinderserumalbumin (35 %)	Sigma
EasyTagTM EXPRE^{35S} Protein Labelling Mix	PerkinElmer
Enzyme für die Molekularbiologie (Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme, T4-DNA-Ligase)	NEB

Substanz	Hersteller
FBS, Fötale Rinderserum (für 20 min bei 56 °C inaktiviert)	Perbio
G418	AppliChem
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	Sigma
Größenmarker	
- für DNA-Agarosegele: SmartLadder	Eurogentec
- für Proteingele: ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range	NEB
peqGOLD Prestained Protein Marker	Peqlab
Polymerasen	
Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase	NEB
OneTaq® DNA-Polymerase	NEB
TurboFect™ Transfektionsreagenz	Fermentas
YT-Medium	Invitrogen

Tab. 8: Enzyme und Substanzen für Molekularbiologie.

2.1.6 Lösungen und Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Medien zeigt Tab. 9. Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser (dH₂O) aus einer „Milli-Q“-Wasseraufbereitungs-Anlage (Millipore) angesetzt. Hitzebeständige Lösungen wurden für 20 min bei gesättigtem Wasserdampf und 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen, wie beispielsweise Antibiotika, wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm).

Lösungen und Medien	Zusammensetzung/Hersteller
Agarose Gele	
Gel	0,8 % bis 2,5 % (w/v) Agarose in TAE-Laufpuffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid
Ladepuffer (5×)	10 mM Tris·HCl, 100 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; pH 8,0
TAE-Laufpuffer (Tris-Acetat-EDTA)	40 mM Tris·HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA; pH 8,0
CD-Puffer	10 mM Tris·HCl, 150 mM NAF; pH 7,5
DMSO-Lösung	99,4 ml DMSO, 0,6 ml Essigsäure (100 %), 10 g SDS
EM-Fixativ	20 % Paraformaldehyd in 0,5 M HEPES Puffer; pH 7,2
Immunfluoreszenzlösungen	
Fixativ	4 % (v/v) Formaldehyd in PBS (+/+)
Permeabilisierungslösung	0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS
PBST	3,2 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5 mM KH ₂ PO ₄ , 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0,05s. Tween-20, pH 7,4
Blockierlösung	3 % (w/v) BSA in PBS
Kompetente <i>E. coli</i> Zellen	
CaCl ₂ -Lösung	100 mM CaCl ₂ ; pH 7,0
CaCl ₂ -Lösung I	100 mM CaCl ₂ , 20 % (v/v) Glycerin; pH 7,0
Medium für <i>E. coli</i> Kultivierung	
YT-Medium	31 g/l in dH ₂ O, autoklaviert
YT-Agar-Platten	YT-Medium mit 1,2 % (w/v) Agar
-Kanamycin (50 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml) wurden zugesetzt	
MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in PBS(-/-), sterilfiltriert

Lösungen und Medien	Zusammensetzung/Hersteller
Plaquetest	
EMEM (2×) („MEM mit EBSS“), ohne Phenolrot	Biozym
Überschichtungsmedium	EMEM (2×) mit 0,4 % BSA, 0,2 % (v/v) FBS, 4 mM L-Gln, 2 µg/ml Trypsin und 200 U/ml Pen/Strep im Verhältnis 1:1 gemischt mit 1,8 % (w/v) geschmolzener, niedrigschmelzender, Agarose (in dH ₂ O)
Neutralrotlösung	0,02 % (w/v) in PBS
Formaldehydlösung	10 % (v/v) in PBS
metabolische Markierung	
Mangelmedium	DMEM ohne Cys, Gln und Met mit 5 mM Gln, 0,2 % BSA, 0,1 % (v/v) FBS, 100 U/ml Pen/Strep und 0,3 mCi/ml (11,1 kBq) [³⁵ S]-Met/Cys
Entwicklungs- und Fixierungslösung	Kodak GBX, Sigma
SDS-PAGE	
Sammelgel-Lösung	5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid, 0,1 % SDS (w/v), 125 mM Tris·HCl (pH 6,8), 0,075 % (w/v) APS, 0,15 % (v/v) TEMED
Trenngel-Lösung	15 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid, 0,1 % SDS (w/v), 375 mM Tris·HCl (pH 8,8), 0,05 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Ladepuffer (4×) - nicht-reduzierend:	5 % (w/v) SDS, 0,5 g/l Bromphenolblau, 25 % (v/v) Glycerin, 500 mM Tris·HCl; pH 6,8
- reduzierend:	wie oben und zusätzlich + 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Laufpuffer	25 mM Tris·HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
Coomassie-Lösung	45 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 2,5 g/l Coomassie-Brilliant Blue G-250 in dH ₂ O
Fixier-/Entfärbungslösung	10 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Ethanol in dH ₂ O
Western Blot	
Transferpuffer	25 mM Tris·HCl, 192 mM Glycerin, 0,05 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol
Blockierlösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST
Waschpuffer-PBST	3,2 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5 mM KH ₂ PO ₄ , 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0,05 % Tween-20; pH 7,4
Zellkultur	
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) mit 4,5 g/l Glucose	PAN-Biotech
Zellkulturmedium	DMEM mit 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Pen/Strep
Einfriermedium	60 % (v/v) DMEM, 30 % (v/v) FBS, 10 % (v/v) DMSO
Infektionsmedium	DMEM mit 0,2 % BSA, 0,1 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 µg/ml Trypsin und 100 U/ml Pen/Strep
Selektionsmedium	DMEM mit 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 500 µg/ml G418 und 100 U/ml Pen/Strep
Opti-MEM	Thermo Fisher
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i> nach Dulbecco) mit (+/+) oder ohne (-/-) Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAN-Biotech

Lösungen und Medien	Zusammensetzung/Hersteller
Trypsin/EDTA	0,05 % Trypsin, 1mM EDTA in PBS (-/-), Sigma
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	100×: 10.000 U/ml (10 mg/ml), Sigma
G418-Lösung	50 mg/ml, in dH ₂ O, steril filtriert

Tab. 9: Lösungen und Medien dieser Arbeit.

2.1.7 Antikörper

Die eingesetzten Verdünnungen für die jeweilige Anwendung (WB -Westernblot, IF -Immunfluoreszenz) sind genannt. Verdünnt wurde i.d.R. in Western Blot Blockierlösung.

Primärantikörper:

- **Kaninchen-Antiserum gegen das Virus der klassischen Geflügelpest** (erhalten von H.-D. Klenk, Philipps-Universität Marburg), 1:2.000, WB
- **14C2**, Monoklonaler Maus Antikörper gegen die Influenza A Udon M2 Ektodomäne (erhalten von J. Rossman, Universität Kent, England), 1:1000, WB
- **Maus anti- β -Catenin** (Sigma), 1:500 in PBS mit 1 % (v/v) BSA, IF

Sekundärantikörper:

- **Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte anti-Maus und -Kaninchen Antikörper** (Sigma), 1:6000 bzw. 1:5.000, WB
- **Alexa568-konjugierter anti-Maus Antikörper** (Invitrogen), 1:1.000, IF

2.1.8 Verbrauchsgüter und Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Materialien sind in Tab. 10 genannt. Nicht genannte Materialien wurden von VWR oder Roth bezogen. Bestandteile der Labor-Grundausrüstung sind nicht aufgeführt. Hitzebeständige Geräte und Gefäße wurden für 20 min bei gesättigtem Wasserdampf und 121 °C autoklaviert und anschließend gegebenenfalls 2 – 3 Tage bei 70 °C getrocknet. Glasgefäße wurden zum Teil bei trockener Hitze (180 °C, 6 h) sterilisiert.

Verbrauchsgut	Hersteller
Filme für Fluorographie: Kodak Biomax XAR	Sigma
Glasbodenschälchen (Ø 35 mm) zur Mikroskopie	MatTek
PVDF- Immobilon-P Membran für Western Blot	Merck
Transwells (6-well) mit PET-Membran (0,4 µm Porengröße)	BD Falcon
Zellkulturflaschen, -schalen und Loch-Platten	Greiner
Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophorese Ausstattung	Bio-Rad
Chemilumineszenz-Detektionssystem Fusion SL	PeqLab
CO ₂ -Inkubator HERAccl 240i (für die Kultur eukaryotischer Zellen)	Thermo Fisher
Geltrockner	UniEquip
„ICYCLER-IQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System“	Bio-Rad
Inkubator Certomat BS-1 (für die Kultivierung von <i>E. coli</i>)	Sartorius
Jasco J-810 Spektrometer, CD-Spektroskopie	Jasco

Gerät	Hersteller
JEM-2100 Transmissionselektronenmikroskop mit Veleta CCD Kamera	JEOL/ Olympus
Konfokalmikroskop FV1000	Olympus
Microplattenlesegerät: Synergy H1 Hybrid Reader	Biotek
NanoDrop®-1000 Spektrophotometer	PeqLab
Netzteil für Elektrophorese und Western Blot: PowerPack P25	Biometra
SDS-PAGE Zubehör	Biometra
Thermocycler „mastercycler gradient“	Eppendorf
Ultrazentrifuge L7-65 (Rotor SW28)	Beckman Coulter
UV-Handlampe Typ HL 254 N, Leuchtmittel 2×4 W	Waldmann
Western Blot-Kammer	Peqlab
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Sigma 3K12	Sartorius

Tab. 10: Verbrauchsgüter und Geräte die in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.1.9 Computergestützte Analysen, Datendokumentation und -verarbeitung

Programme die für computergestützte Analysen und die Datendokumentation verwendet wurden zeigt Tab. 11. Text- und weitere Bildbearbeitungen sowie statistische Analysen erfolgten mit Standard-Programmen der Firma Microsoft (Office 2003).

HeliQuest (http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/) ²²⁹ - Bestimmung des hydrophoben Moments einer Helix
ExPASy (http://www.expasy.org/tools/protparam.html)- Bestimmung molekularer Kennwerte für Proteine
Adobe Photoshop 7.1 - Bildbearbeitung
SymPhoTime Version 4.1.3 oder 4.7.3 (PicoQuant)- FLIM-Analyse
ImageJ 1.38t (http://rsb.info.nih.gov/ij/)- Fluoreszenz-Intensitätsbestimmung
GraphPad Prism 6.01- Graphen und Statistik
Jpred4 (http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/index.html) ²³⁰ - Helixvorhersage
Olympus FV 1000 3.1
Bio-1D , Vilber-Lourmat (Eberhardzell)- Quantifizierungen von Banden
NEBcutter V2.0 (http://nc2.neb.com/NEBcutter2/) ²³¹ - Restriktionskartierung von Plasmiden und Ausarbeitung von Klonierungsstrategien
Chromas (http://www.technelysium.com.au/chromas.html)- Sequenzanalysen und-vergleiche
EMBOSS (http://www.ebi.ac.uk/tools/emboss/)- Sequenzanalysen und-vergleiche
MAFFT Programm (http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mart/software/) ²³² -Sequenzalignment (innerhalb der Subtypen)
MUSCLE Server (http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html) ²³³ -Alignment der Subtyp Konsensussequenzen
WebLogo3 Programm (http://weblogo.threeplusone.com/) ^{234,235} -graphische Darstellung von Alignments

Tab. 11: Für Computergestützte Analysen und Datendokumentation verwendete Programme.

2.1.9.1 Analyse der Aminosäurekonservierung von HA-Sequenzen

Influenza-A-Virus HA-Aminosäuresequenzen wurden aus der Influenzadatenbank (<http://www.fludb.org/>), die 33254 Einträge vollständiger HA-Sequenzen von H1 bis H17 Subtypen enthielt, im April 2014 extrahiert. Nachdem redundante Sequenzen entfernt wurden, blieben 17311 einzigartige Sequenzen übrig, die alignt wurden. Davon gehörten 11543 Se-

quenzen zum Gruppe 1- und 5768 zum Gruppe 2-HA-Subtyp. Das Alignment innerhalb der Subtypen wurde unter Verwendung des MAFFT-Programmes durchgeführt. Dieses basiert auf dem FFT-NS2 Algorithmus. Der MUSCLE-Server wurde genutzt um die Subtyp Konsensussequenzen zu alignen. Zur graphischen Darstellung der Sequenzkonservierung wurde das WebLogo3 Programm verwendet. Anzumerken ist, dass Sequenzen des H1 (~6400), H3 (~4300) und H5 (~2600) Subtyps in der Influenzadatenbank überrepräsentiert sind und die Konsensussequenz über alle Subtypen (Abb. 36A) nicht ausgewogen ist. Daher wurde zusätzlich die Konsensussequenz für jeden einzelnen Subtyp ermittelt (Abb. 36B). Die Analyse wurde von L. Kordyukova (A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moskau, Russland) durchgeführt.

2.1.10 Firmensitze

Affymetrix (Hallbergmoos), AppliChem (Darmstadt), BD Falcon (Heidelberg), Beckman Coulter (Krefeld), Bio-Rad (München), Biochrom (Berlin), Biometra (Göttingen), Biotek (Bad Friedrichshall), Biozym (Hessisch Oldendorf), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Eurogentec (Köln), Fermentas/Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Ibidi (Martinsried), Invitek (Berlin), Invitrogen (Karlsruhe), JASCO (Gross-Umstadt), JEOL (München) Lonza (Verviers, Belgien), MatTek (Ashland, USA), Merck & Millipore (Schwalbach), NEB: New England BioLabs (Frankfurt am Main), Olympus (Hamburg), PAN-Biotech (Aidenbach), Peqlab (Erlangen), Perbio (Bonn), PerkinElmer (Rodgau), PicoQuant (Berlin), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Sartorius (Göttingen), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Stratagene/Agilent (Waldbronn), Stratec (Birkenfeld), Thermo Fisher Scientific (Braunschweig), UniEquip (Martinsried), VWR (Darmstadt), Waldmann (Villingen-Schwenningen).

2.2 Methoden

Wenn nicht anders erwähnt, fanden die Experimente bei Raumtemperatur (Rt, etwa 20 °C) statt; „Zellkulturbedingungen“ sind 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchtigkeit.

2.2.1 Molekularbiologie - Gentechnische Konstruktion von Plasmiden

Die zur Herstellung von Konstrukten dieser Arbeit verwendeten Plasmide, Primer, synthetischen Genfragmente, ihre Eigenschaften sowie die zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen und Strategien finden sich in Kap. 2.1.2. Einige Plasmide dieser Arbeit wurden mittels PCR (Kap. 2.2.1.7 und 2.2.1.8) erzeugt. Andere Plasmide wurden generiert, indem DNA-Fragmente (mit dem interessierenden Gen-Abschnitt) per Restriktion (Kap. 2.2.1.1) aus Plasmiden oder synthetischen DNA-Fragmenten gewonnen und diese dann in einen, mit den gleichen Restriktionsendonukleasen behandelten, Zielvektor inseriert wurden („Ligation“, Kap. 2.2.1.2). Die DNA wurde hierfür direkt nach der Restriktion einer Agarose-

Gelelektrophorese unterworfen, aus dem Gel aufgereinigt (Kap. 2.2.1.3) und in der Ligation eingesetzt. Chemokompetente *E. coli* Bakterien (Kap. 2.2.1.4) wurden mit den so generierten Plasmiden transformiert und auf Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum (gegen das der Zielvektor Resistenz verleiht) selektiert (Kap. 2.2.1.5). Flüssigkulturen wurden aus einzelnen Kolonien angesetzt, aus denen die Plasmid-DNA isoliert (Kap. 2.2.1.6), mittels Restriktionsverdau analysiert (Kap. 2.2.1.1) und schließlich sequenziert wurde.

2.2.1.1 Restriktion von DNA

Die ortsgerichtete Spaltung von DNA durch spezifische Restriktionsendonukleasen erfolgte in Gesamtvolumina von 20-50 µl entsprechend der Empfehlungen der Bezugsfirma. Für den Verdau von 1 µg DNA wurden je 2-10 U Enzym zugesetzt. Doppelrestriktionen erfolgten in einem Ansatz, sofern die Aktivität beider Enzyme unter den gewählten Bedingungen noch mindestens 50 % betrug. War dies nicht der Fall, wurde nacheinander erst mit Endonuklease I und nach Reinigung mit dem „Invisorb Fragment CleanUp“-Kit, mit Endonuklease II geschnitten. Analytische Restriktionen wurden für ca. 1 h bei 37 °C, präparative Ansätze für 4 h oder über Nacht inkubiert, anschließend mit Ladepuffer versetzt und per Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.1.3) analysiert. Dem präparativen Restriktionsansatz der Vektoren, in welche nachfolgend die entsprechenden Fragmente ligiert werden sollten, wurde pro 1 µg Vektor DNA 1 U des Enzyms alkalische Phosphatase (CIP, *calf intestinal phosphatase*) zugesetzt. Das Enzym dephosphoryliert die 5'-Enden des geschnittenen Vektors und verhindert somit die intra- und intermolekulare Ligation der Vektoranteile im Ligationsansatz.

2.2.1.2 Ligation

Die Ligierung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden erfolgte in 30 µl Ansätzen, die den Vektoranteil und das Insertionsfragment in einem molaren Verhältnis von 1:4 enthielten, mit 1-2 U des Enzyms T4-DNA-Ligase entsprechend der Herstellerangaben. Der Gesamt-DNA-Gehalt im Ansatz betrug etwa 0,5-1 µg. Der Ansatz wurde für 2 h bei Rt oder für 16 h bei 4 °C inkubiert und anschließend zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in horizontalen Agarosegelen entsprechend ihrer Größe²³⁶ diente der Analyse, aber auch der Präparation definierter DNA-Fragmente aus dem Agarosegel. DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumenanteilen Ladepuffer versetzt, auf ein ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (1 % bzw. 2 % (w/v) für Fragmente kleiner 1.500 bp) geladen und einer Elektrophorese bei konstanter Spannung von 100 V unter-

worfen. Durch die fluoreszierenden Eigenschaften des Ethidiumbromids, und dessen Interkalation in die doppelsträngige DNA, konnten die DNA-Banden durch eine UV-Handlampe (Anregungswellenlänge: 302 nm) visualisiert werden. Die Größenbestimmung der Fragmente erfolgte durch Vergleich mit dem „SmartLadder“, einem DNA-Größenstandard, von dem 5 µl auf das Gel aufgetragen wurden. Die Banden wurden gegebenenfalls mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem Kit „Invisorb Spin DNA Extraction“ bzw. für Fragmente unter 250 bp mit dem Kit „JETsorb Gel Extraction“ entsprechend der Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue wurde dieser in einen für die Transformation kompetenten Zustand gebracht. Dafür wurden 20 ml auf 37 °C vorgewärmtes YT-Medium mit 200 µl einer frischen Übernachtskultur beimpft und für 2-3 h bei 37 °C auf einem Schüttler (200 rpm) bis zu einer OD₅₇₈ von ~ 0.6 kultiviert. Vor der Ernte wurde die Kultur für 5 min auf Eis gekühlt. Die Zentrifugation erfolgte in sterilen 50 ml-Falcon-Röhrchen (10 min, 4 °C, 4000 rpm); das Zellpellet wurde in 5 ml eiskalter, steriler CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 3 ml eiskalter CaCl₂-Lösung I resuspendiert, in vorgekühlte 1,5-ml-Reaktionsgefäße zu 200 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sie konnten so über mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden.

2.2.1.5 Transformation von *E. coli*

Um Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (Kap. 2.2.1.4) einzubringen, wurde ein 200 µl Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, 15 µl Ligationsansatz (Kap. 2.2.1.2) oder 1-2 ng Plasmid-DNA hinzugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec, gefolgt von 2 min Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml YT-Medium wurde der Ansatz 1 h schüttelnd (180 rpm) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (4000 rpm, 3 min, Rt) und der Überstand auf 100 µl reduziert; in diesem Volumen wurde das Zellpellet resuspendiert, auf einer Agarplatte mit geeignetem Selektivmedium ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.6 Übernachtskultur, Präparation und Quantifizierung von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde YT-Medium (mit geeignetem Selektionsantibiotikum) mit einer einzelnen *E. coli*-Zellen Kolonie inokuliert und über Nacht schüttelnd

(200 rpm) bei 37 °C inkubiert. Durch Zentrifugation (8.000×g, 5 min) erhielt man ein Bakterien Pellet, aus welchem, wie nachfolgend beschrieben, die DNA präpariert wurde.

Die Plasmidisolierung in kleinem Maßstab erfolgte basierend auf der Methode der alkalischen Lysis²³⁷ unter Verwendung des „Invisorb Spin Plasmid Mini Two“-Kits entsprechend der Herstellerangaben. Das Verfahren beruht auf der Bindung von DNA an eine Silikatmatrix in Anwesenheit chaotroper Salze. Die Präparation der DNA erfolgte aus 2-4 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur. Die Isolierung von sehr reiner, Endotoxin-freier Plasmid DNA in großem Maßstab, z.B. für präparative Restriktionen oder für die reverse Genetik (Kap. 2.2.4.1) erfolgte unter Verwendung des „PureYield“-Kits, basierend auf Anionenaustausch-Chromatographie, aus 100 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur entsprechend der Herstellervorgaben. Die DNA-Quantifizierung erfolgte photometrisch per NanoDrop-Spektrometer durch Messung der Absorption bei 260 nm.

2.2.1.7 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR²³⁸ dient der spezifischen Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte mittels Oligonukleotid-Primern, die den Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes komplementär sind. Die Primer werden an der denaturierten DNA in Anwesenheit von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP's) durch eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert. Eine Standard PCR-Reaktion mit der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase fand in einem Thermocycler in einem Volumen von 50 µl und mit folgenden Zusätzen statt: 10 µl Phusion HF-Puffer (5×), 200 µM dNTPs, 0,5 µM Vorwärts-Primer, 0,5 µM Rückwärts Primer, 1-5 ng isolierte Plasmid-DNA als Matrize und 1 U Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. Die Bedingungen einer Standardreaktion mit 30 Zyklen gestalteten sich nach dem initialen Aufschmelzen der DNA (30 sec, 98 °C) wie folgt: 10 sec, 98 °C (Trennung des DNA-Doppelstrangs); 20 sec, 55-70 °C (Anlagerung der Primer, die genaue Temperatur orientiert sich an der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide) und 15 sec- 3 min, 72 °C (Extension der Primer, 15-30 sec/kb der Matrize). Abschließend wurde zum Auffüllen unvollständiger Amplifikate für 10 min bei 72 °C inkubiert und der Reaktionsansatz bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Zur Analyse der entstandenen PCR-Produkte wurden 3 µl jedes PCR-Ansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.1.3) aufgetrennt. Für die Verwendung in einer Ligation (Kap. 2.2.2.2.) wurde das Fragment einer Restriktion (Kap. 2.2.1.1) mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese unterworfen und schließlich mit einem entsprechenden Kit (Kap. 2.1.4) aus dem Gel aufgereinigt.

2.2.1.8 Mutagenese per inverser PCR

Bei der inversen PCR wird ein Paar zueinander komplementärer, die gewünschte Mutation tragender Primer, die im Gegensatz zur herkömmlichen PCR nicht aufeinander zugerichtet, sondern in die umgebenden Bereiche orientiert sind, eingesetzt. Das gesamte Plasmid wird so amplifiziert und anschließend direkt zur Transfektion von *E. coli* eingesetzt^{239,240}. Um die Bildung von Primerdimeren zu minimieren, erfolgt vor der PCR die getrennte Extension jeweils eines Primers an der Matrize (isolierte Plasmid-DNA). Für einen Reaktionsansatz von 50 µl wurden 10 µl Phusion HF-Puffer (5×), DNA-Matrize mit einer Endkonzentration von 10 ng/µl, 200 µM dNTPs, 1 U Phusion High-Fidelity DNA Polymerase und 125 ng Vorwärts- oder Rückwärts-Primer eingesetzt. Das Temperaturprofil war folgendes: 30 sec, 98 °C (1×); [10 sec, 98 °C ; 20 sec, 55-70 °C; 3 min, 72 °C] (3×). Der Reaktionsansatz wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Jeweils 25 µl des Reaktionsansatzes mit Vorwärts- und Rückwärts Primer wurden dann gemischt und erneut 1 U Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase hinzu gegeben. Die Bedingungen für die PCR-Reaktion mit 30 Zyklen gestalteten sich wie oben beschrieben. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit der Restriktionsendonuklease DpnI (1 µl/Ansatz, 2 h, 37 °C) behandelt. DpnI ist spezifisch für methylierte DNA und baut Reste des Matrizen Plasmids ab, nicht aber das unmethylierte PCR-Produkt, welches die gewünschte Mutation tragen sollte. Zehn Mikroliter des Ansatzes werden in *E. coli* XL1-blue transformiert und auf LB-Platten mit geeignetem Selektionsantibiotikum ausplattiert (vgl. Kap. 2.2.1.5).

2.2.2 Zellkultur und Mikroskopie

2.2.2.1 Zellkultur eukaryotischer Zellen

CHO-K1-, HEK293T- und MDCKII-Zellen wurden in adhärenter Kultur in 75 cm² (T75) oder 175 cm² (T175) Zellkulturflaschen mit 10 bzw. 18 ml Zellkulturmedium unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Erreichten die Zellen eine Konfluenz (Bedeckung des Flaschenbodens) von über 90 % (typischerweise nach 2-3 Tagen), so wurden sie mit 10 ml PBS (-/-) gewaschen und mit 2 ml (T75) bzw. 5 ml (T175) Trypsin-EDTA bei 37 °C bis zum Ablösen vom Flaschenboden inkubiert. Die Zellen wurden dann in 8 bzw. 18 ml DMEM suspendiert und im Verhältnis 1:10 oder 1:15 (abhängig vom Zelltyp) in eine Flasche mit frischem Medium überführt oder für Experimente (am darauffolgenden Tag) typischerweise im Verhältnis 1:2 oder 1:3 ausgesät.

2.2.2.2 Zellkonservierung und Auftauen

Um eukaryotische Zellen über eine längere Zeit zu konservieren wurden die Zellen einer etwa 90 % konfluenten Zellkulturflasche wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA behandelt, in Medium aufgenommen und zentrifugiert (200×g, 10 min, Rt). Das Zellpellet wurde in Einfriermedium aufgenommen, und der Inhalt einer T75-Flasche auf drei Cryotubes verteilt. Diese wurden in einem Isopropanol-Einfrierbehältnis über Nacht bei -80 °C gelagert, so dass ein langsames Herrunterkühlen von etwa 1 °C pro min erfolgte. Die Proben wurden dann in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt und darin gelagert. Um kryokonservierte Zellen aufzutauen, wurde ein Aliquot in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, in 7 ml warmes DMEM-Medium aufgenommen und zentrifugiert (200×g, 5 min, Rt). Das Zellpellet wurde in warmem Medium aufgenommen und in eine T75-Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden ein- bis zweimal gesplittet, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.2.2.3 Transfektion von Expressionsplasmiden für die Konfokalmikroskopie

Um ein bestimmtes Protein in eukaryotischen Zellen zu exprimieren, wurde ein Expressionsplasmid, kodierend für das jeweilige Protein, durch Transfektion unter Verwendung des Turbofect Reagenz entsprechend der Herstellerangaben in die Zellen eingebracht. Hierfür wurden CHO-K1-Zellen in 35 mm Glasboden- oder in 35 mm Schälchen ausgestattet mit drei Deckgläschen (d= 12 mm, HCl-behandelt) bis zu einer Konfluenz von etwa 70-90 % kultiviert. 4 µg Plasmid-DNA wurden mit 6 µl Turbofect Reagenz und 400 µl OptiMEM-Medium gemischt und für 20 min inkubiert. Die Zellen wurden mit vorgewärmten PBS (+/+) gewaschen und mit 1,6 ml OptiMEM-Medium bedeckt. Das Transfektionsgemisch wird dazu gegeben, durch leichtes Schwenken gemischt und die Schälchen bei 37 °C inkubiert. Nach 4-6 h wurde das Medium durch OptiMEM-Medium mit 100 U/ml Pen/Strep ersetzt.

2.2.2.4 Präparate für die Mikroskopie

Für FLIM-FRET-Messungen (Kap. 2.2.2.7) wurden lebende Zellen verwendet, für die anderen mikroskopischen Betrachtungen wurden die Zellen jedoch fixiert. Hierfür wurden 24 h nach der Transfektion die Zellen auf den Deckgläschen (oder der PET-Membran, s. Kap. 2.2.6) mit PBS gewaschen, für 15 min in 3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert, 2 min mit PBS, mit 0,1 M Glycin in PBS und erneut mit PBS gewaschen und mit 4 µl Mowiol invers auf einem Objektträger fixiert. Die Präparate härteten innerhalb eines Tages aus, wurden dunkel, bei 4 °C gelagert und in den folgenden Tagen mikroskopiert.

2.2.2.5 Konfokalmikroskopie

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie ermöglicht eine größere Bildschärfe als die konventionelle Mikroskopie, indem das Präparat mit einem Anregungslaserstrahl Punkt für Punkt abgerastert sowie das Emissionslicht, das nicht aus der Fokusebene stammt, mittels einer Lochblende ausgeblendet wird²⁴¹. Die Bild-Aufnahmen und Messungen wurden mit einem invertierten Olympus FluoView1000-Mikroskop bei 25 °C durchgeführt. Ein Öl-Immersions-Objektiv mit einer 40×- bzw. 60× Vergrößerung (n.A.: 1,25 bzw. 1,35) oder ein 60× Wasserobjektiv (n.A.: 1,2) wurden verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore, die Anregungsquellen (und typischerweise genutzten Laserintensitäten, angepasst an die Signalstärke) sowie die Detektionsbereiche sind in Tab. 12 dargestellt. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden durch die Anregung einzelner Fluorophore gewonnen. Zusätzlich wurde ein Differential-Interferenz-Kontrastbild (DIC) aufgenommen.

Fluorophor	Anwendung	Anregungsquelle	Detektionsbereich
Cerulean (Cer)	FLIM-FRET-Messung	458-nm-Argonlaser (5-12 %)	470-490 nm
YFP		515-nm-Argonlaser (0,3-4 %)	535-575 nm
GFP	Visualisierung der M2-Lokalisation in polarisierten Zellen	488-nm-Argonlaser (10 %)	495-545 nm
Alexa568		559-nm-Laserdiode (5 %)	570-670 nm
RFP	Untersuchung der Plasmamembranlokalisation von M2-AH Mutanten	559-nm-Laserdiode (5-10 %)	570-670 nm

Tab. 12: In dieser Arbeit verwendete Fluorophore, Anregungsquellen und Detektionsbereiche.

2.2.2.6 Polares Wachstum von Zellen und Immunfluoreszenzfärbung

Um die Lokalisation des M2-Proteins in Zellen, die einen polaren Phänotyp besitzen, zu untersuchen, wurden MDCKII-Zellen in Transwells (Abb. 11) kultiviert¹²². Die Zellen wachsen darin auf einer Polyester (PET)-Membran und haben von oben und unten Zugang zu Nährstoffen aus dem Medium, so dass sie einen polaren Phänotyp ausbilden. MDCKII-Zellen wurden in Transwells in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h später, bei einer Konfluenz von etwa 80 %, mit dem entsprechenden Expressionsplasmid, kodierend für die zu untersuchende M2-Variante fusioniert an ein Fluoreszenzprotein (GFP), transfiziert (Kap. 2.2.2.3). Einen Tag nach der Transfektion erfolgte der Wechsel auf Selektionsmedium, welches jeden Tag gewechselt wurde. 14 Tage nach der Transfektion wurde die PET-Membran mit einem Skalpell aus der Halterung herausgeschnitten und die Zellen, wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben, fixiert. Vor der Einbettung in Mowiol wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der basolateralen

Membranbereiche unter Verwendung von Standardmethoden²⁴² durchgeführt. Dies ermöglichte eine bessere Einschätzung der apikalen Lokalisation der exprimierten M2-GFP-Varianten am Mikroskop. Die fixierten Zellen auf der PET-Membran wurden hierfür für 3 min mit 0,5 % (v/v) Triton-X-100 in PBS behandelt (Permeabilisation der Zellen), dreimal mit PBS gewaschen und zum Sättigen unspezifischer Bindestellen für 1 h mit Blockierlösung inkubiert. Dann wurde für 45 min mit dem Primärantikörper, anti- β -Catenin, inkubiert (Rt), dreimal mit PBS gewaschen, für 45 min mit Alexa568-markierten Zweitantikörper inkubiert, mit PBS gewaschen und jeweils eine Membranhälfte mit 8 μ l Mowiol invers auf einem Objektträger fixiert. Die Zellen wurden ausgehend vom apikalen Zellbereich bis zum Boden in 0,5 μ m Schritten in z-Richtung unter gleichzeitiger Anregung der beiden Fluorophore, dokumentiert und mit der FluoView1000 Software visualisiert. Es wurde ein z-Stapel erstellt und mit einem 3D-Programm ein Schnitt in z-Richtung durch die Zellen generiert.

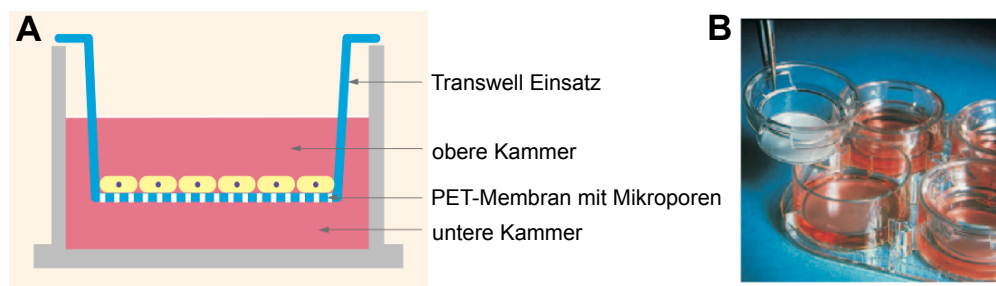


Abb. 11: Schematische Darstellung eines Transwells. **A:** Die Zellen werden in der oberen Kammer, auf der PET-Membran, ausgesät. Die Poren der PET-Membran ermöglichen eine Nährstoffaufnahme auch von unten, was zur Ausbildung eines polaren Zellphänotyps führt. **B:** 6-Loch-Platte mit Membraneinsätzen (entnommen aus der Produktinformation von Corning).

2.2.2.7 Messung des Förster-Resonanzenergietransfers über Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie (FLIM-FRET)

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist der strahlungslose Transfer von Energie von einem angeregten Donor-Fluorophor auf ein geeignetes Akzeptor-Fluorophor, der stattfindet, wenn sich beide Moleküle in großer räumlicher Nähe (< 10 nm) befinden. Die FRET-Effizienz hängt dabei von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor ab und ist somit ein sehr sensitives Maß für den Abstand zweier Moleküle^{94,243,244}. Diese Tatsache macht man sich beim Nachweis der Assoziation zweier Proteine, fusioniert mit entsprechenden Fluorophoren (das Emissionsspektrum des Donor-Moleküls und das Anregungsspektrum des Akzeptormoleküls müssen überlappen), zunutze. Nach Anregung des Donor-Fluorophors kann FRET über die Emissionsintensität des Akzeptors oder, wie in der vorliegenden Arbeit, als Reduktion der

Lebenszeit des angeregten Zustandes des Donors in Gegenwart des Akzeptors, gemessen werden. Letzteres bietet den Vorteil der internen Kalibrierung und dass keine Korrektur der Donor Fluorophoremission in den Akzeptor Emissionskanal erfolgen muss. Die Fluoreszenzlebenszeit ist die durchschnittliche Zeit, die ein Molekül nach Absorption eines Photons im angeregten Zustand verbleibt, bevor es in den Grundzustand zurückkehrt und liegt typischerweise im Nanosekunden Bereich²⁴⁴. Befindet sich der angeregte Donor in räumlicher Nähe zu dem geeigneten Akzeptor, so stellt FRET einen zusätzlichen Weg der Energieabgabe für den Donor dar, der dadurch schneller in den Grundzustand zurückzukehrt, die Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Moleküls ist reduziert.

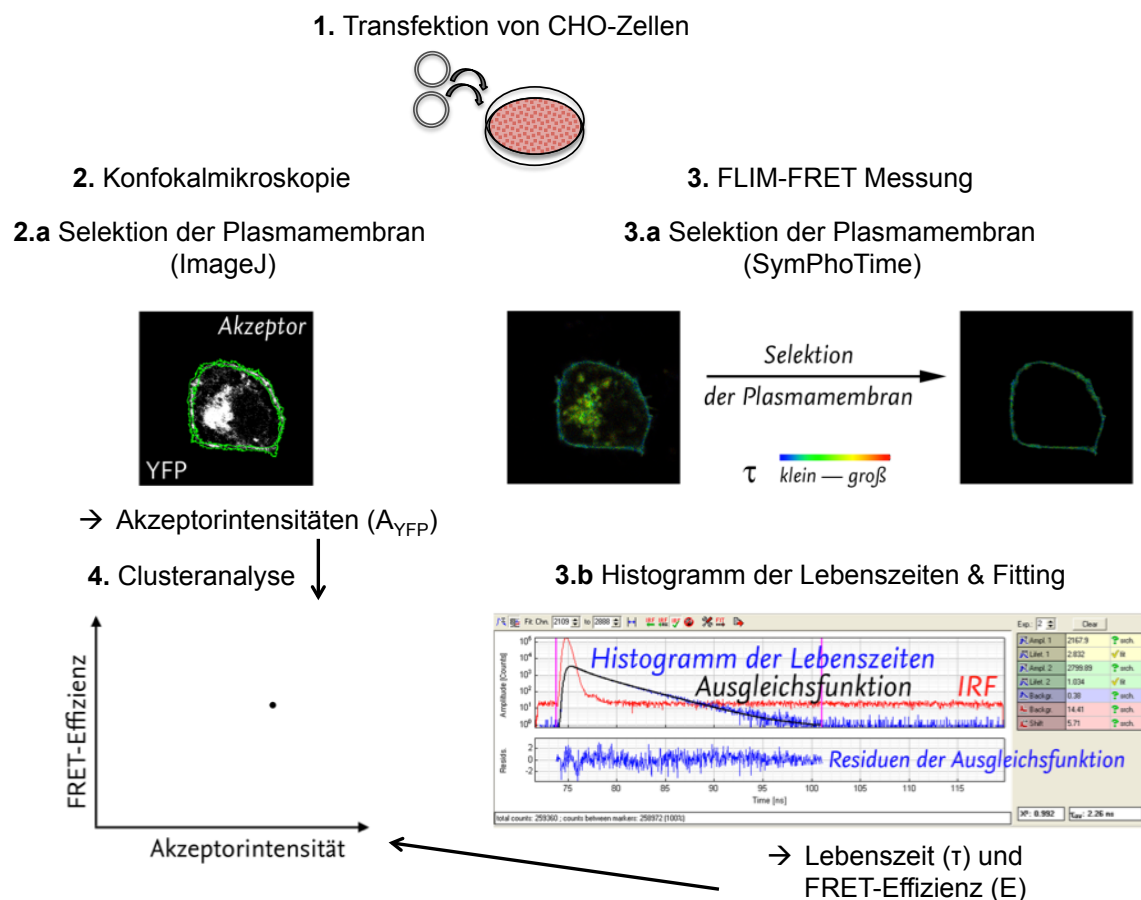


Abb. 12: Durchführung und Auswertung von FLIM-FRET-Messungen. Zunächst werden Zellen mit Konstrukten, kodierend für die zu untersuchenden Cer- bzw. YFP-Fusionsproteine, kotransfiziert (1.). Von Zellen, die beide Proteine an der Plasmamembran koexprimieren, werden konfokalmikroskopische Aufnahmen erstellt (2.). Durch Selektion der Plasmamembran im Programm ImageJ kann dann die Akzeptorfluoreszenzintensität (grüner Auswahlbereich) in der Plasmamembran ermittelt werden (2.a), die für die Clusteranalyse (4.) benötigt wird. An der gleichen Zelle wird auch die FLIM-FRET-Messung (für Details siehe Text) durchgeführt (3.). **3.a:** FLIM-Aufnahme einer Zelle mittels SymPhoTime, wobei die Farbgebung die mittlere Fluoreszenzlebenszeit darstellt. Der gleiche Plasmamembranbereich wie in 2.a wird ausgewählt. **3.b:** Ein Lebenszeithistogramm (blaue Kurve) für den ausgewählten Bereich wird erstellt und unter Berücksichtigung der Instrument-Antwortfunktion (IRF, rote Kurve) eine biexponentielle Ausgleichsfunktion (schwarz) angepasst. Das Programm SymPhoTime liefert die Parameter (rechts) sowie die Residuen (blau) der Ausgleichsfunktion, die der Evaluation der erhaltenen Daten dienen. Man erhält die mittlere Donor-Lebenszeit (τ_{DA}) für diese Zelle, aus der sich die FRET-Effizienz, wie im Text beschrieben ermitteln lässt. Diese wird in der Clusteranalyse (4.), nach Zacharias *et al.*²²⁷, gegen die Akzeptorintensität in der gleichen Zelle aufgetragen. Abbildung nach Thaa¹⁰¹, modifiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde FLIM-FRET genutzt, um die Interaktion von HA-Cer (FRET-Donor)- mit M2-YFP (FRET-Akzeptor)-Fusionsproteinen in der Plasmamembran lebender Zellen zu analysieren. Die Durchführung erfolgte im Wesentlichen wie in Refs. 184, 217 und 245 und wurde für jedes Probenpaar an mindestens zwei unabhängigen Messtagen durchgeführt. Das Arbeitsschema ist in Abb. 12 gezeigt. CHO-K1-Zellen in 35 mm Glasbodenschälchen wurden mit 4 µg der jeweiligen HA-Cer-Variante und 0,1 µg der jeweiligen M2-YFP-Variante kotransfiziert. Nach 24 h wurden von einzelnen Zellen, die beide Proteine an der Plasmamembran zeigten, unter sequenzieller Anregung der Cer- und YFP-Fluoreszenz konfokalmikroskopische Aufnahmen generiert (Abb. 12-1 und -2).

An den gleichen Zellen wurde anschließend die FLIM-Messung mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC- *time-correlated single-photon counting*) mit dem zeitauflösenden LSM-Upgrade-Kit (PicoQuant) durchgeführt. Hierfür wurde die Cerulean Fluoreszenzemission mit einer gepulsten Laserdiode angeregt und die emittierten Photonen mit einer Einzelphotonen-Lawinen-Photodiode (SPAD-*single photon avalanche photodiode*, PicoQuant) und einem 470±15-nm-Filter detektiert und unter Verwendung einer TimeHarp200 PC-Karte verarbeitet. Für 90 sec wurden Bilder mit einer Photonenzählrate von 20.000-40.000 pro sec akkumuliert. (Abb. 12-3). Auch die interne Antwortfunktion (IRF) des Systems wurde berücksichtigt. Sie wurde an jedem Messtag ermittelt, indem unter FLIM-Messbedingungen das Streulicht der 440-nm-Laserdiode an einem Wassertropfen auf einem Objektiv für 60 sec detektiert wurde. Insgesamt wurden für jede Kombination mindestens 30 Zellen an mindestens zwei verschiedenen Messtagen vermessen. Zur Ermittlung der mittleren Fluoreszenzlebenszeit wurden geeignete Zellplasmamembranbereiche auf den FLIM-Bildern ausgewählt und die in diesem Bereich detektierten Photonen mittels der SymPhoTime Software in einem Lebenszeithistogramm dargestellt. Durch das Anpassen einer biexponentiellen Abklingfunktion an das Histogramm (unter Berücksichtigung der IRF) ergeben sich die individuellen Fluoreszenzlebenszeiten (τ) und Amplituden der Fluoreszenzabklingkurve (vgl. Abb. 12-3a und -3b). Die mittlere Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Gegenwart des Akzeptors (τ_{DA}) wurde für jede Zelle mit folgender Formel ermittelt:

$$\tau_{DA} = (\sum_i \alpha_i \tau_i) / (\sum_i \alpha_i) \quad (1)$$

Wobei α_i die Amplitude der Lebenszeit der i-ten Komponente und τ_i die dazugehörige Lebenszeit ist. Um die Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors (τ_D) zu bestimmen, wurden an jedem Messtag ebenfalls zehn Zellen, die nur den Donor exprimierten, analysiert. Aus den so generierten Daten lässt sich dann die FRET-Effizienz E (in %), die

angibt, welcher Anteil der Anregung des Donors in einen Energietransfer auf den Akzeptor resultiert, über folgende Formel berechnen:

$$E = (1 - \tau_{DA} / \tau_D) \times 100 \quad (2)$$

Wobei τ_{DA} die mittlere Fluoreszenzlebenszeit des Donors in einer Einzelzelle, die Donor und Akzeptor koexprimiert, und τ_D die mittlere Lebenszeit der zehn Zellen, die nur den Donor exprimieren, ist.

2.2.2.7.1 FRET-Clusteranalyse

In einem zweidimensionalen System wie der Zellplasmamembran können sich die Membranproteine nur lateral bewegen. Dies begünstigt, dass auch durch eine rein zufällige Interaktion FRET erfolgen kann. Neben der FRET-Effizienz wird daher gemäß Zacharias *et al.*²²⁷ die Clusteranalyse zur Einschätzung der Interaktion der untersuchten Membranproteine herangezogen. Hierfür wird das Verhältnis zwischen der relativen Akzeptorintensität (als Maß für die Akzeptorkonzentration) und der FRET-Effizienz untersucht. Anhand des vor jeder FLIM-Messung aufgenommenen Bildes der Akzeptoremission wurde mit dem Programm ImageJ die mittlere Fluoreszenzintensität des Akzeptors an der Plasmamembran (A_{YFP}), ermittelt (vgl. Abb. 12-2a). Die Werte wurden hintergrundkorrigiert und auf die Laserintensität normiert, indem der höchste Wert jeder Messkombination eins gesetzt wurde. Letzteres geschah, um sowohl das Altern der Laser und den damit zusammenhängenden absoluten Intensitätsverlust im Laufe der Zeit, als auch erfolgte Austausche von Lasern während des Versuchszeitraumes zu berücksichtigen.

Die FRET-Effizienz E jeder Zelle wurde dann gegen die auf eins normierte Fluoreszenzintensität des Akzeptors (A_{YFP}) an der Plasmamembran dieser Zelle aufgetragen (vgl. Abb. 12-4) und in GraphPad Prism an folgende hyperbolische Funktion, die die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor beschreibt, angepasst:

$$E = (E_{\max} \times A_{YFP}) / (A_{YFP} + K_D) \quad (3)$$

Die Gleichung liefert den Fitparameter K_D , der als relatives Maß für die spezifische Assoziation („Clustern“) der beiden betrachteten Proteine dient²²⁷. Ist der K_D -Wert verglichen mit den Akzeptorintensitäten sehr klein, so geht man davon aus, dass Donor und Akzeptor clustern, die FRET-Effizienz ist unabhängig von der Akzeptorkonzentration. Liegt der K_D -Wert hingegen im gleichen Bereich oder ist der Wert sogar größer, als die Akzeptorintensitäten (A_{YFP}), so findet FRET nur aufgrund zufälliger Zusammenstöße der beiden Proteine statt, die FRET-

Effizienz ist über einen großen Konzentrationsbereich direkt von den Akzeptorkonzentrationen abhängig und es besteht ein linearer Zusammenhang (vgl. Abb. 15, Kap. 3.2).

2.2.2.8 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Virusüberstände infizierter MDCKII-Zellen wurden geerntet und durch niedertourige Zentrifugation (2000×g, 5 min, 4 °C) von Zelltrümmern befreit. Der Virustiter wurde bestimmt und Aliquots, die etwa 10^7 pfu/ml enthielten, mit 1/10 Volumen EM-Fixativ, welches zuvor für 20 min auf 65 °C erhitzt wurde, gemischt, für 1 h bei Rt inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Die Analyse der Proben erfolgte durch Lars Möller am Robert Koch-Institut in Berlin. Ein Tropfen (10 µl) der Testlösung wurde direkt auf einen Elektronenmikroskopprobenhalter (400 Netzkupfergitter, bedeckt mit einem kohlenstoffverstärkten Plastikfilm) mit Glimmentladung platziert. Nach zehnminütiger Adsorption bei Rt, wurden die Gitter dreimal in doppelt destilliertem Wasser gewaschen und mit 1 % Uranylacetat negativ gefärbt. Die Gitter wurden mit einem JEM-2100 Transmissionselektronenmikroskop, betrieben bei 200 KV, betrachtet. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer Veleta CCD-Kamera bei einer Auflösung von 2048×2048 Pixel aufgenommen.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE²⁴⁶ wird durch die denaturierende Wirkung des negativ geladenen Natrium-Dodecylsulfats (SDS) und dessen Anlagerung an die Proteine, die Auftrennung von Proteinuntereinheiten im elektrischen Feld entsprechend ihrer molekularen Größe ermöglicht. Die Methode wurde zur Analyse von Virus enthaltenden Zellkulturüberständen sowie durch Ultrazentrifugation gewonnenen Viruspellets verwendet (Kap. 2.2.4.4). Für die Herstellung der Gele wurde ein Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch verwendet, dessen Polymerisation zwischen den zwei aufrechtstehenden Glasplatten durch Zugabe von APS/TEMED vermittelt wurde. Die Konzentration des totalen Monomers lag für Sammelgele bei 5 % und für Trenngele bei 15 % (w/v). Die aufzutrennenden Proben wurden mit 0,3 Volumen SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C erhitzt, 5 min bei 14.000×g zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde zusätzlich ein Protein-Größenmarker auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei Rt in vertikalen Gelelektrophorese-Apparaturen zunächst bei einer Stromspannung von 80 V und wurde nach Eintritt der Proben in das Trenngel auf 180 V erhöht. Die Gele wurden dann entweder zur Visualisierung der Proteinbanden mit Coomassie-Blau-Lösung behandelt

(Kap. 2.2.3.2), in einem Western Blot eingesetzt (Kap. 2.2.3.3) oder für die Analyse mittels Fluorographie getrocknet (Kap. 2.2.3.4).

2.2.3.2 Coomassie-Blau Färbung

Die Visualisierung von Proteinbanden im Polyacrylamidgel erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Wilson²⁴⁷. Hierzu wurden die Gele nach der Elektrophorese für 20 min in Coomassie-Blau Färbelösung inkubiert und anschließend, bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in Fixier-/Entfärbelösung geschwenkt.

2.2.3.3 Western Blot

Mit diesem Verfahren wurden die Proteine nach der SDS-PAGE (Kap. 2.2.3.1) elektrophoretisch vertikal aus dem (ungefärbten) Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert und anschließend mit Antikörpern spezifisch nachgewiesen²⁴⁸. Drei Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Filterpapier wurden auf der Anodenplatte des Elektrottransfergerätes platziert. Darauf folgte die PVDF-Membran (zuvor für 15 sec in Methanol und anschließend für 5 min in Transferpuffer inkubiert), das Gel (zuvor für 20 min in SDS-freiem Transferpuffer gespült), erneut drei Lagen Filterpapier und schließlich die Kathodenplatte. Für den sauberen Transfer der Proteine auf die Membran ist es wichtig, eine Luftblasenbildung bei der Schichtung zu vermeiden. Der Transfer erfolgte innerhalb von 60 min mit einer Stromstärke von 2,5 mA/cm² Gelfläche. Anschließend wurde die PVDF-Membran für 60 min bei Rt in Blockierlösung geschwenkt (30 rpm), um eine unspezifische Bindung des Anti-Körper Konjugats an die Membran zu unterbinden. Für mindestens 2 h oder über Nacht (30 rpm, 4 °C) wurde dann mit einer gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper-Lösung (Kap. 2.1.7) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST (je 5 min) wurde mit der Zweitantikörperlösung, in welcher der Antikörper an Merrettichperoxidas (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist, für 30-45 min (30 rpm) inkubiert. Nach erneut dreimaligem Waschen konnten nun unter Verwendung eines Detektionskits die Proteinbanden per Chemilumineszenz visualisiert werden. Hierbei wurde mit einer Kamera (Fusion SL) die Lichtemission als Folge des HRP-vermittelten Substratumsatzes detektiert.

2.2.3.4 Fluorographie

Wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine bei ihrer Synthese radioaktiv markiert (Kap. 2.2.4.5), so können sie durch Auflegen eines hochsensitiven Röntgenfilms sichtbar gemacht werden²⁴⁹. Dafür wurden die SDS-Gele 1 h schwenkend (30 rpm) in Fixier-/Entfärbelösung, 15 min in H₂O und 30 min in 1 M Salicylat (ein Szintillator zur Signalver-

stärkung) inkubiert, im Gelrockner auf einem Stück Whatman-Papier getrocknet und in einer lichtdichten Filmkassette mit einem Röntgenfilm bestückt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach 3 Tagen (für eine Markierung mit [^{35}S]) wurde der Film in einer Dunkelkammer entsprechend der Herstellerangaben entwickelt, getrocknet und dokumentiert.

2.2.3.5 CD-Spektroskopie

Die Circular dichroismus (CD) Spektroskopie ist eine gut geeignete Methode um die Sekundärstruktur von Proteinen und Peptiden in Lösung zu untersuchen^{250,251}. Sie basiert auf dem Prinzip, dass optisch aktive Moleküle linear polarisiertes Licht (eine Überlagerung gegensätzlich zirkular polarisierten Lichtes gleicher Amplitude und Phase) unterschiedlich stark absorbieren und diese Unterschiede als Elliptizität, als Funktion der Wellenlänge des Lichtes, messbar sind. Bei optisch nicht aktiven Molekülen ist hingegen die Summe der Absorption von links- und rechtshändig zirkular polarisierten Lichtes null. Sekundärstrukturen wie α -Helices, β -Faltblätter und zufällig organisierte Bereiche in Proteinen oder Peptiden liefern charakteristische Spektren. Für die CD-Messung^{252,253} wurden lyophilisierte Peptide mit einer Reinheit größer 95 % in CD-Puffer mit einer Endkonzentration von $60\text{ }\mu\text{M}$ aufgenommen. Die Messung erfolgte in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Koksche (Chemie Dahlem) mit einem Jasco J-810 Spektrometer bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Quartzküvette mit 1 mm Weglänge. Die Spektren wurden über einen Bereich von 190 bis 250 nm mit einer 0,2 nm-Schritt-Auflösung (Scangeschwindigkeit: 50 nm/min) 15 mal aufgenommen und der Mittelwert abzüglich der Werte aus einem Kontrollspektrum für Puffer dargestellt.

2.2.3.6 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Zell-Vitalitätstest²⁵⁴, der darauf basiert, dass die Mitochondrien-Dehydrogenasen vitaler, metabolisch aktiver Zellen den gelben Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) reduzieren können, wodurch das blauviolette Formazan gebildet wird, welches sich kolorimetrisch quantifizieren lässt. Zu 90 % konfluente MDCKII-Zellen in 96-Loch-Platten wurden mit einer m.o.i. von 0.001 der zu untersuchenden Viren infiziert und 16, 24 und 48 h nach der Infektion der MTT-Test durchgeführt, um den Anteil intakter Zellen in jedem Loch zu quantifizieren. Hierfür wurden dem Medium ($100\text{ }\mu\text{l}$), $20\text{ }\mu\text{l}$ MTT-Lösung zugesetzt und für 2 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Danach wurde der Zellkulturüberstand entfernt und $150\text{ }\mu\text{l}$ Dimethylsulfoxid (DMSO)-Lösung auf die Zellen gegeben, so dass diese lysiert werden und das gebildete Formazan freigesetzt wird. Nach 10 min wurde die Absorption (OD) bei 570 nm in einem

Microplattenlesegerät ermittelt. Der (relative) Anteil intakter Zellen in jedem Loch wurde aus dem durchschnittlich gemessenen OD₅₇₀-Wert, für jede Probe bezogen auf den OD₅₇₀-Wert, der für nicht-infizierte Zellen bestimmt wurde, ermittelt.

2.2.4 Virologische Methoden

2.2.4.1 Reverse Genetik

Die Herstellung rekombinanter Influenza-A-Viren des WSN-Stammes erfolgte mit der Methode der „reversen Genetik“ basierend auf dem „Acht-Plasmid System“²²⁶. Jedes Plasmid enthält die cDNA eines einzelnen Genomsegments des Virus, flankiert von Promotoren für die RNA-Polymerasen I und II, für die Synthese von v- bzw. mRNA. Die Plasmide wurden per Kotransfektion in 293T-Zellen (6 cm-Schalen, Konfluenz von 80-90 %) eingebracht. Die Transfektion wurde mit Turbofect entsprechend der Herstellerangaben, wie in Kap. 2.2.2.3 beschrieben, unter Verwendung von 1 µg DNA eines jeden Plasmids durchgeführt. Nach 4-6 h erfolgte der Wechsel auf Infektionsmedium. Zellen die alle acht Plasmide aufgenommen haben, produzieren rekombinante Viren, welche in den Zellkulturüberstand freigesetzt werden. Dieser wurde 48 h nach der Transfektion geerntet, durch Zentrifugation für 5 min bei 2.000×g von Zelltrümmern bereinigt und bei -80 °C aufbewahrt oder direkt auf MDCKII-Zellen vermehrt. Dafür wurde 1 ml Überstand auf ein 6 cm-Schälchen mit Zellen gegeben, für 1 h unter gelegentlich leichtem Schwenken inkubiert, anschließend der Überstand entfernt und durch Infektionsmedium ersetzt und nach 2-4 Tagen, wenn ein cytopathischer Effekt (das Absterben der Zellen infolge der Virusinfektion) sichtbar war, die Viren wie oben beschrieben geerntet.

2.2.4.2 Plaquetest

Um zu ermitteln, wie viele infektiöse Viruspartikel sich in einem definierten Volumen Zellkulturüberstand befinden, wurde ein Plaquetest durchgeführt. Hierfür wurde eine serielle zehnfach-Verdünnungsreihe (in Infektionsmedium) der zu untersuchenden Virussuspension hergestellt und 500 µl jeder Verdünnung zur Infektion konfluenten MDCKII-Zellen in 6-Loch-Platten eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation unter Zellkulturbedingungen mit leichtem Schwenken alle 10 min wurde der Überstand verworfen, die Zellen zwei mal mit PBS (+/+) gewaschen und anschließend mit 3 ml 37 °C warmem, agarosehaltigem Überschichtungsmedium überschichtet. Nach Erhärten der Agarose, die die freie Diffusion der Viren unterbindet, wurden die 6-Loch-Platten unter Zellkulturbedingungen für 3 Tage inkubiert. Zur Visualisierung der Löcher („Plaques“) im Zellrasen, die durch die Infektion mit einem einzi-

gen Viruspartikel aus der eingesetzten Testsuspension und die Ausbreitung der neu generierten Viren auf die direkten Nachbarzellen entstanden sind, wurde dann für 4 h eine Lebendzellsfärbung mit Neutralrotlösung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit Formaldehydlösung fixiert, die Agarose entfernt, die Platten getrocknet, dokumentiert und die Plaques gezählt. Der Virustiter des untersuchten Überstandes ergab sich durch Multiplikation der Plaquezahl mit der Verdünnungsstufe und Normierung auf 1 ml als Plaque-bildende Einheiten (*plaque-forming units*) pro Milliliter (pfu/ml).

2.2.4.3 Hämagglutinationstest

Auch der Hämagglutinations (HA) -Test dient der Quantifizierung der Viruspartikel, die sich in einem definierten Volumen befinden und basiert auf der Fähigkeit des Hämagglutinin (HA)-Proteins von Influenzaviren rote Blutzellen zu agglutinieren. Der HA-Test erfasst somit auch nicht-infektiöse Partikel, deren HA noch funktionell ist. Für den Test wurde frisches Hühnercitratblut (erhalten von der Geflügelklinik in Berlin Döberitz) dreimal in sterilem PBS (-/-) gewaschen (5 min, 2000×g) und eine Arbeitslösung von 0,5 % hergestellt. Eine zweifache Verdünnungsserie der Virussuspension mit einem Endvolumen von 50 µl pro Loch wurde in 96-V-Loch Mikrotiter-Platten vorbereitet. Zu jeder Vertiefung wurden 50 µl der Blutzelllösung gegeben, gemischt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Ist ausreichend aktives HA vorhanden, so werden die roten Blutzellen vernetzt (Agglutination) und ein Gitter bildet sich. Ist kein oder zu wenig aktives HA vorhanden, so findet keine Vernetzung der Blutzellen statt, sie sinken auf den Boden und sind als roter Punkt in der V-Vertiefung sichtbar. Der Titer wurde entsprechend der Verdünnung definiert, in der die letzte stabile Gitterstruktur beobachtet wurde.

2.2.4.4 Virusvermehrung

Die Vermehrung von Influenzaviren erfolgte auf MDCKII Zellen in 6 cm Schälchen, T25, -75 oder -175 Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden am Vortag so ausgesät, dass sie am Versuchstag eine Konfluenz von 90-100 % besaßen. Das Zellmedium wurde entfernt, einmal mit PBS gewaschen und die virushaltigen Überstände auf den Zellrasen gegeben. Die eingesetzte Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle (m.o.i., *multiplicity of infection*) betrug typischerweise 0,01 (für eine mehrstufige Vermehrung) oder 1 (für eine Einschnitt-Vermehrung). Das Volumen hoch konzentrierter Virusaussgangssuspensionen wurde mit Infektionsmedium auf 1, 2 bzw. 5 ml (für kleine, mittlere bzw. große Zellkulturflaschen) erhöht. Die Virussuspensionen wurden für 1 h auf dem Zellrasen belassen, alle 10 min leicht geschwenkt, dann verwor-

fen, die Zellen zwei mal mit PBS (+/+) gewaschen, mit Infektionsmedium versehen und unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Jeden Tag wurden die Zellen per Mikroskop auf einen cytopathischen Effekt, das Absterben der Zellen infolge der Virusinfektion, untersucht. Dieser trat bei Ein-Schritt-Vermehrungen typischerweise nach einem, bei Mehr-Schritt-Vermehrungen etwa nach 2-4 Tagen, ein. Der Überstand wurde von Zelltrümmern befreit (2.000×g, 10 min, 4 °C) und in Aliquots bei -80 °C gelagert oder die Viren durch Ultrazentrifugation (28.000 r.p.m., 2 h, 4 °C) pelletiert, in 100 µl PBS (+/+) resuspendiert und per SDS-PAGE gefolgt vom Western Blot (Kap. 2.2.3.3) analysiert.

2.2.4.5 Metabolische Markierung von Viren

Radioaktiv markierte Viruspartikel wurden durch die Infektion von MDCKII-Zellen in 15 cm Schalen mit einer m.o.i. zwei oder vier hergestellt. Drei Stunden nach der Infektion wurde das Infektionsmedium (ohne Trypsin) durch Mangelmedium ersetzt und nach weiteren 21 h die Überstände geerntet, von Zelltrümmern befreit (2.000×g, 10 min, 4 °C) und die Viren durch Ultrazentrifugation (28.000 r.p.m., 2 h, 4 °C) pelletiert, in 100 µl PBS (+/+) resuspendiert und per SDS-PAGE (Kap. 2.2.3.1) unter nicht-reduzierenden Bedingungen und Fluorographie (Kap. 2.2.3.4), oder per SDS-PAGE gefolgt vom Western Blot (Kap. 2.2.3.3) analysiert.

2.2.4.6 Wachstumskurve

Um die Wachstumskinetik von Viren zu untersuchen wurden zu 90 % konfluente MDCKII-Zellen in 6-Loch-Platten mit rekombinanten WSN-Viren typischerweise mit einer geringen m.o.i. von 0,001 in einem Volumen von 500 µl (in Infektionsmedium) infiziert. Nach 1 h Inkubation unter Zellkulturbedingungen mit gelegentlichem Schwenken der Platte wurde der Überstand entfernt, mit PBS (+/+) gewaschen, 3 ml Infektionsmedium in jedes well gegeben und bei Zellkulturbedingungen weiter inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots des Zellkulturüberstandes entnommen, von Zelltrümmern gereinigt (2.000×g, 5 min) und bis zur Titerbestimmung per Plaquetest (Kap. 2.2.4.2) bei -80 °C gelagert.

2.2.4.7 RNA-Präparation aus Viren, reverse Transkription und PCR

Um zu Überprüfen, ob die generierten rekombinanten Viren die gewünschte Mutation enthalten, wurde der entsprechende Bereich der Proteine HA und/oder M2 sequenziert. Hierfür wurde aus virushaltigem Zellkulturüberstand die virale RNA mit dem „Invisorb Spin Virus RNA Mini“-Kit entsprechend der Herstellerangaben isoliert, in einer reversen Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben und per Polymerase Kettenreaktion (PCR, vgl. Kap. 2.2.1.7) mit M2- oder HA-spezifischen Primern (s. Kap. 2.1.2.3) amplifiziert. Reverse Transkription

und PCR erfolgten hierbei im selben Reaktionsansatz mit dem „OneStep RT“-PCR Kit entsprechend der Herstellerangaben. Je 5 µl des PCR-Produktes wurden anschließend mit dem „ExoSAP-IT Cleanup“-Kit entsprechend der Herstellerangaben behandelt, um Reste von Primern und dNTPs, die bei der Sequenzierungsreaktion stören könnten, zu entfernen. Die so erhaltenen Proben wurden dann durch die Firma GATC (Konstanz) sequenziert.

2.2.4.8 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Analyse des Genomgehalts von Viruspartikeln wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt²⁵⁵. Um eine äquivalente Anzahl von Virionen zu analysieren wurde der Überstand infizierter MDCKII-Zellen auf einen HA-Titer von 2^6 adjustiert und daraus mit dem „Invisorb Spin Virus RNA Mini“-Kit RNA isoliert. Mit dem „Maxima H Minus First Strand cDNA Synthese“-Kit wurde dann cDNA synthetisiert. Hierfür wurden 4 µl RT-Puffer (5×), 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl Oligo (dT)₁₈-Primer (100 µM), 1 µl Maxima H Minus Enzymmix und 13 µl RNA pro Ansatz eingesetzt und für 30 min bei 50 °C inkubiert. Durch Inkubation bei 85 °C für 5 min wurde die Reaktion terminiert. Das Reaktionsprodukt wurde direkt in einer qPCR mit Primern, die spezifisch für das Influenzavirus A M-Gensegment waren, eingesetzt. Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt 5 µl OneTaq-Puffer (5×), 16 µl RNAase-freies Wasser, 0,5 µl dNTPs (100 µM), je 0,25 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (100 µM), 0,75 µl TaqMan-Sonde (10 µM), 0,25 µl OneTaq DNA-Polymerase und 2 µl cDNA als Matrize. Das Temperaturprofil des ICYCLER-IQ5 war folgendes: 3 min, 95 °C (1×); [10 sec, 95 °C; 30 sec, 55 °C (Anlagerung und Elongation)] (40×). Fluoreszenzwerte (FAM) wurden während des Anlagerungsschrittes gesammelt. Eine Standardkurve wurde unter Verwendung serieller Verdünnungen von RNA, die durch *in vitro* Transkription des M-Segments erhalten wurde, erstellt. Die Expressionslevel lassen sich anhand der $2^{-\Delta \Delta C_t}$ -Methode ermitteln.²⁵⁶

3 ERGEBNISSE

In den ersten beiden Abschnitten wird die Bedeutung der M2-Acylierung und Cholesterol-Bindemotive (CRAC) für den apikalen M2-Transport sowie der Einfluss der Raft-Lokalisationssignale von M2 und HA auf deren Assoziation per FLIM-FRET untersucht. Teilergebnisse wurden bereits veröffentlicht²⁵⁷.

3.1 Acylierung und CRAC-Motive von M2 werden nicht für dessen apikalen Transport benötigt

Im Zuge der Knospung müssen die viralen Proteine zur apikalen Plasmamembran der Wirtszelle transportiert werden⁵⁴. Die dafür verantwortlichen intrinsischen Signale des M2-Proteins sind bisher nicht identifiziert. Frühere Arbeiten ergaben, dass der Mechanismus des apikalen Lipid- und Proteintransportes Membran-Rafts involvieren könnte^{116,117} (vgl. Kap. 1.2.3). Das legt die Möglichkeit nahe, dass die potenziellen Raft-Assoziationsmotive des M2, eine S-Acylierung sowie Cholesterol-Bindemotive, für den Transport zur apikalen Plasmamembran polarisierter Epithelzellen von Bedeutung sein könnten und wurde daher untersucht.

Frühere Studien zeigten, dass M2 (C-terminal fusioniert an ein Fluorophor) palmitoyliert wird, Oligomere bildet und effizient an die Plasmamembran transfizierter Zellen gebracht wird^{217,218}. Des Weiteren werden nach Ansäuerung Protonen aus dem Medium in das Cytoplasma von Zellen befördert, das Protein ist somit funktionell²⁵⁸.

Folgend wurde die Lokalisation von M2-Varianten mit zerstörten potenziellen Raft-Lokalisationssignalen fusioniert an GFP (grün fluoreszierendes Protein, M2-GFP) in polarisierten Epithelzellen (MDCKII-Zellen) untersucht. In den M2-Varianten war das im Wildtyp acylierte Cys50 durch Serin ersetzt und/oder die Cholesterol-Bindemotive durch Substitution der zentralen Tyrosine an Position 52 und 57 im CP-Bereich durch Serin unterbrochen (vgl. Abb. 10C). Die verwendeten Konstrukte waren die gleichen, wie in der Studie von Thaa *et al.*²¹⁸. MDCKII-Zellen wurden in Transwell-Filtern ausgesät, mit dem zu untersuchenden M2-GFP-Konstrukt transfiziert, bis zur Polarisation der Zellen kultiviert und wie in Kap. 2.2.2.6 beschrieben für die Konfokalmikroskopie präpariert. Abb. 13 zeigt zwei konfokale xy/xz/yz Schnitte repräsentativer Zellen in der apikalen (Abb. 13A) bzw. der zentralen (basolateralen) Region (Abb. 13B). Die apikale und basolaterale Zelloberfläche von Epithelzellen sind durch eine verschiedene Protein- und Lipidzusammensetzung charakterisiert und durch „tight junctions“ voneinander getrennt. Das Protein β -Catenin ist ein typischer Bestandteil der Adhärensverbindungen von Zell-Zell-Kontakten im basolateralen Bereich und kann mittels Immun-

fluoreszenz mit einem β -Catenin-Primärantikörper (rot) visualisiert werden^{259,260}. Dies bestätigte, dass die Zellen im vorliegenden Experiment einen polaren Phänotyp aufweisen. M2-GFP (grün) ist deutlich im Bereich der apikalen Zellplasmamembranen vorhanden, aber nicht in basolateralen Bereichen, da es keine nennenswerte Überlappung der beiden Signale gibt (vgl. Abb. 13A, B und C). Somit wurde zunächst gezeigt, dass M2-GFP, wie auch M2 ohne Fluorophor⁶⁶, zur apikalen Oberfläche von Epithelzellen transportiert wird. Weiterhin ergab die Untersuchung, dass auch M2-GFP Varianten mit zerstörten Raft-Lokalisationsmotiven zur apikalen Plasmamembran transportiert werden (Abb. 13D-F). Weder eine fehlende Acylierung (C50S, Abb. 13D), die Zerstörung der Cholesterol-Bindemotive (Y52S, Y57S, Abb. 13E), noch eine Kombination der Mutation beider Motive (Abb. 13F) führte zu einer Veränderung der M2-Lokalisation in polarisierten Zellen.

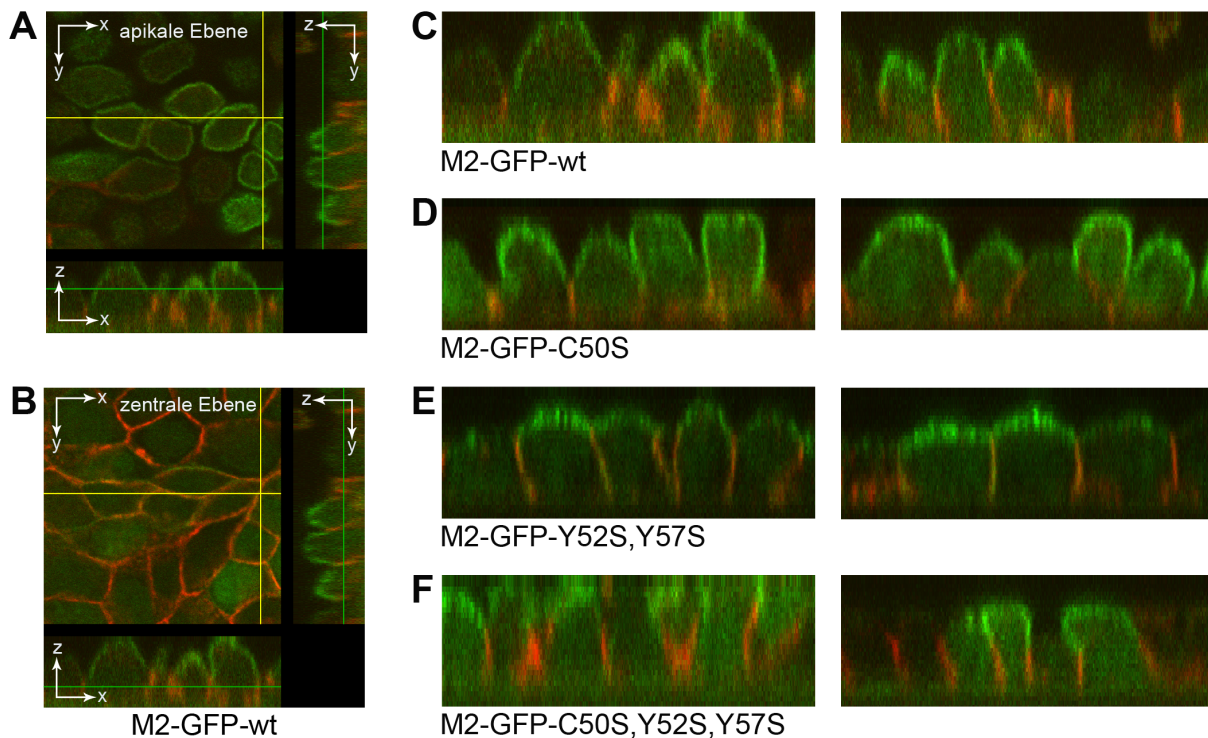


Abb. 13: M2 mit zerstörten Raft-Lokalisationsmotiven wird weiterhin zur apikalen Plasmamembran polarisierter MDCKII-Zellen transportiert. In Transwells ausgesäte MDCKII-Zellen wurden mit den angegebenen M2-GFP-Varianten transfiziert und zur Ausbildung eines polaren Phänotyps für 14 Tage kultiviert. Die Visualisierung der exprimierten M2-GFP-Varianten (grün) erfolgte per Konfokalmikroskopie (z-Stapel). Der basolaterale Membranteil ist rot (Immunfluoreszenz anti- β -Catenin). **A und B:** Repräsentativer Bereich von M2-GFP-exprimierenden MDCKII-Zellen mit Schnittebene im apikalen (**A**) und basolateralen (**B**) Bereich, xy-Ebene und xz/yz-Schnitte wie angezeigt. **C-F:** Repräsentative z-Schnitte polarisierter Zellen, transfiziert mit den angegebenen M2-GFP-Varianten.

Im folgenden Kapitel wurde der Einfluss der Raft-Lokalisationssignale von HA und M2 auf deren Assoziation per FLIM-FRET untersucht.

3.2 FLIM-FRET-Messungen zur Bedeutung der (putativen) Raft-Lokalisationssignale von HA und M2 für deren Assoziation

Das Protein HA trägt wesentlich zur Organisation der Knospungszone von Influenzaviren bei, indem es mit den Membran-Rafts der Plasmamembran interagiert und diese zu einer Plattform für die Assemblierung neuer Viren stabilisiert⁵⁵. Engel *et al.*¹²² haben gezeigt, dass HA fusio- niert mit einem Fluorophor (HA-Cer, Cerulean), in transfizierten CHO-Zellen mit der glei- chen Kinetik wie Wt-HA (ohne Anhänge an der Proteinsequenz) trimerisiert, S-acyliert wird und Endo-H-resistente Kohlenhydrate erwirbt. Des Weiteren ist HA-Cer an der Plasmamemb- ran lokalisiert, bindet an und fusioniert mit Erythrozyten, ist also funktionell (C. Sieben, M. Veit, und A. Herrmann, unveröffentlicht). FLIM-FRET-Messungen (vgl. Kap. 2.2.2.7) zwi- schen verschiedenen HA-Varianten und dem Raft-Marker des inneren cytosolischen Memb- ranblattes (Myr-Pal-YFP) in der Plasmamembran lebender Zellen zeigten, dass die drei Acy- lierungen im C-terminalen Bereich und das VIL-Motiv zu Beginn der TMD des HA (vgl. Abb. 14A links) für die Interaktion mit Rafts von großer Bedeutung sind^{94,184,245}. FLIM- FRET-Messungen zeigten auch, dass individuell exprimiertes M2 nicht mit dem Raft-Marker, aber mit den durch HA organisierten größeren, stabilisierten Raft-Domänen in der Plasma- membran clustert und zwar unabhängig von anderen Proteinen²¹⁷. Die Zerstörung beider Raft- Motive des HA reduzierte das Clustern mit M2 signifikant. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst die Bedeutung der einzelnen HA-Raft-Lokalisationssignale für das Clustern mit M2 bestimmt werden. Anschließend wurden die Raft-Lokalisationssignale des M2 (vgl. Abb. 14A rechts) hinsichtlich ihrer Bedeutung für das Clustern mit Wt-HA in der Plasma- membran untersucht. Zugrunde lag hier die von Schroeder *et al.*²¹⁵ aufgestellte Theorie, nach der die beiden potenziellen Raft-Assoziationsmotive des M2 (zusammen mit der relativ kur- zen TMD) für die Lokalisation des M2 am Rand der Knospungszone und somit auch für die generelle Interaktion mit den Raft-Domänen der Knospungszone verantwortlich sind.

Zur Klärung dieser Fragen wurden FLIM-FRET-Messungen in der Plasmamembran lebender Zellen, die HA- und M2-Varianten, markiert mit einem geeigneten FRET-Donor (Cerulean) und FRET-Akzeptor (*yellow-fluorescent protein*, YFP) koexprimierten, durchgeführt (Abb. 14A). Die Messungen erfolgten in transient transfizierten, nicht-polarisierten CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen, 24 h nach der Transfektion. Die verwendeten Konstrukte wurden von B. Thaa und S. Engel erhalten.

Zunächst wurde die Methode validiert, indem ältere Ergebnisse für HA-Cer-wt und M2-YFP-wt aus der Studie von Thaa *et al.*²¹⁷ reproduziert wurden. Abb. 14B zeigt die konfo- kalen Bilder einer repräsentativen kotransfizierten Zelle und bestätigt, dass beide fluo- res-

zenzmarkierten Proteine an der Plasmamembran koexprimiert werden. Die Fluoreszenzlebenszeiten von HA-Cer-wt in Gegenwart des FRET-Akzeptors M2-YFP-wt von 31 Zellen wurden bestimmt und die FRET-Effizienzen, wie in Kap. 2.2.2.7 beschrieben, ermittelt. Diese lagen, wie in vorherigen Experimenten auch, in einem größeren Bereich verteilt und reichten von 1,1 % bis 32,4 %. Der Mittelwert der FRET-Effizienz \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) war mit $10,5 \pm 1,4$ % kleiner, als in vorherigen Experimenten ($16,3 \pm 1,2$ %).

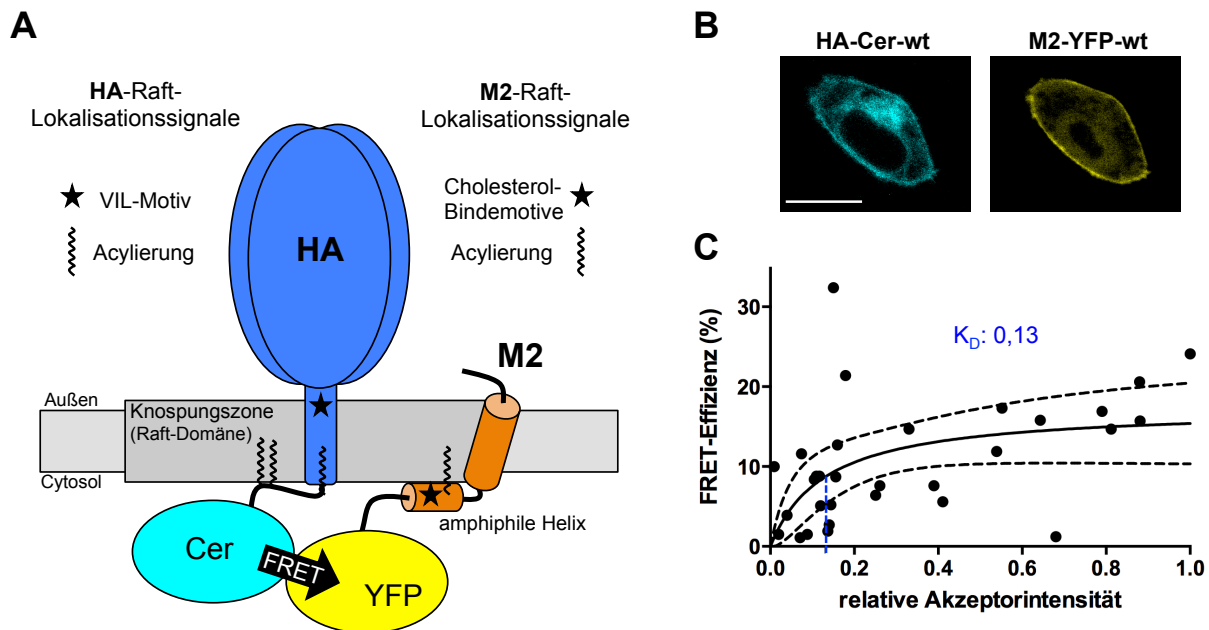


Abb. 14: FLIM-FRET-Analyse zum Clustern von HA und M2. **A:** Schematische Darstellung von HA und M2 fusioniert mit Cerulean (Cer, FRET-Donor) bzw. YFP (FRET-Akzeptor). HA interagiert mit der Knospungszone per Acylierung an drei Cysteinen (gewellte Linien) und dem VIL-Motiv (Stern). M2 trägt zwei potenzielle Raft-Lokalisierungssignale in einer AH im CP-Bereich: Eine Acylierung (gewellte Linie) und Cholesterol-Bindemotive (Stern), von denen angenommen wird, dass sie M2 an den Rand der Knospungszone bringen. **B:** Repräsentative CHO-Zelle, transient kotransfiziert mit HA-Cer-wt und M2-YFP-wt, visualisiert per Konfokalmikroskopie, an der FLIM zur Bestimmung von FRET durchgeführt wurde. Maßstab = 10 μ m. **C:** Die FRET-Effizienz jeder Zelle wurde gegen die relative Akzeptorintensität in derselben Zelle aufgetragen. Der hyperbolische Fit (schwarze durchgängige Linie, gestrichelte Linie: 95 % Konfidenzintervall) liefert den Wert K_D , der es ermöglicht, eine Aussage über das Clustern zu treffen. Zellzahl (n) = 31, mittlere FRET-Effizienz $E \pm$ SEM: $10,5 \pm 1,4$ %, $K_D \pm$ SEM: $0,13 \pm 0,09$. Der geringe K_D -Wert zeigt Clustern an. Die Daten stammen von mindestens zwei unabhängigen Messtagen.

Wie bereits in früheren Publikationen beschrieben, liefern FRET-Effizienzen nicht immer eine verlässliche Aussage über die Spezifität der Interaktion membranassoziierter Proteine^{227,261}. Das liegt daran, dass Membranproteine lediglich im zweidimensionalen Raum der Membran diffundieren und es daher besonders bei hohen Proteinkonzentrationen auch durch zufällige Interaktion zum Energietransfer kommen kann. Um diesen Umstand zu berücksichtigen, wurde das Clustern der beiden zu untersuchenden Proteine analysiert. Dazu wurde die FRET-Effizienz jeder einzelnen Zelle gegen die Akzeptor-Fluoreszenzintensität

(welche proportional zur Akzeptorkonzentration ist) in dieser Zelle aufgetragen und eine hyperbolische Ausgleichsfunktion, welche beispielsweise auch die Wechselwirkung eines Rezeptors mit seinem Liganden beschreibt, durch die Datenpunkte gelegt (Fitting) (s. Abb. 15).

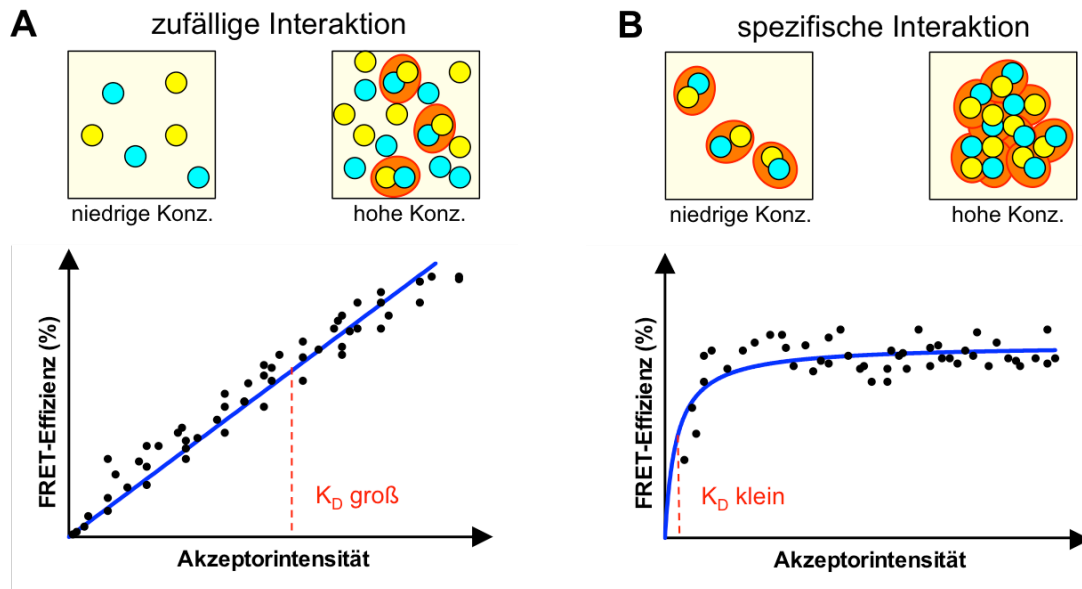


Abb. 15: Prinzip der Clusteranalyse für FLIM-FRET-Daten. **A:** Donor (blau) und Akzeptor (gelb) können im zweidimensionalen System der Membran, besonders bei hohen Akzeptorkonzentrationen, zufällig zusammenstoßen (rote Bereiche) und FRET erzeugen, der nicht auf einer spezifischen Interaktion der beiden Proteine beruht. Die FRET-Effizienz (E) steigt dann mit zunehmender Akzeptor-Fluoreszenzintensität (A) an, was durch die Auftragung der FRET-Effizienz jeder gemessenen Zelle gegen die Akzeptorintensität in dieser Zelle veranschaulicht wird. Die an die Daten angepasste Ausgleichsfunktion $E = E_{\max} \times A / (A + K_D)$ liefert einen, gemessen an der Akzeptorintensität, hohen K_D -Wert. Die rote Linie kennzeichnet die Lage des K_D -Werts auf der Abszisse. **B:** Ist die Interaktion zwischen FRET-Donor und -Akzeptor spezifisch, so ist die FRET-Effizienz relativ unabhängig von der Akzeptorkonzentration. Die Ausgleichsfunktion liefert einen geringen K_D -Wert, die Proben „clustern“. Gemäß Zacharias *et al.*²²⁷.

Beruhend die gemessenen FRET-Effizienzen auf einer zufälligen Interaktion zwischen den beiden Proteinen, wie in Abb. 15A, so nimmt die FRET-Effizienz linear mit steigender Akzeptorintensität zu, ist also direkt von der Akzeptorkonzentration abhängig. Die an die Daten angepasste Ausgleichsfunktion liefert dann, verglichen mit den Akzeptorintensitäten, einen relativ hohen K_D -Wert. Der K_D -Wert ist ein Fitparameter zur Beschreibung der FRET-Effizienz E in Abhängigkeit von der Akzeptorintensität A. Er wird als relatives Maß herangezogen, um zu beurteilen, ob zwei Proteine miteinander clustern. Handelt es sich um eine spezifische Interaktion zwischen den beiden untersuchten Proteinen (z.B. wenn diese sich binden oder in denselben Membrandomänen, wie Rafts, vorkommen), so ist die FRET-Effizienz weitestgehend unabhängig von der Akzeptorkonzentration und die maximale FRET-Effizienz wird bereits bei niedrigen Akzeptorkonzentrationen erreicht (Abb. 15B). Die Ausgleichsfunktion liefert dann einen, gemessen an den Akzeptorintensitäten, sehr geringen K_D -Wert.

Für die Clusteranalysen der vorliegenden Arbeit wurden normierte Akzeptorintensitäten verwendet (die höchste Akzeptorintensität jeder Messung wurde eins gesetzt), um einen besseren Vergleich der Messungen untereinander und mit den Messungen früherer Studien zu ermöglichen, die z.B. mit anderen Lasern durchgeführt wurden und dadurch andere Fluoreszenzintensitäten ergaben. Die Clusteranalyse von HA-Cer-wt mit M2-YFP-wt ergibt eine Kurve mit flachem Anstieg und einen relativen K_D -Wert von 0,13 (Abb. 14C) und ist damit vergleichbar mit dem aus der Studie von Thaa *et al.*²¹⁷ erhaltenen Wert für das gleiche FRET-Paar (relativer K_D -Wert = 0,09). Somit wurde bestätigt, dass HA-Cer-wt und M2-YFP-wt in der Plasmamembran lebender Zellen clustern.

3.2.1 HAs Raft-Assoziationsmotive werden für das Clustern mit M2 benötigt

Als Nächstes wurde die Bedeutung der einzelnen Raft-Lokalisationssignale des HA für das Clustern mit M2 ermittelt. In HA-Raft-Lokalisationsmutanten sind die acylierten Cysteine durch Serin ersetzt, was zu nicht-acyliertem HA führt, die Aminosäuren des VIL-Motivs sind durch Alanin substituiert¹⁸⁴. Engel *et al.*¹⁸⁴ zeigten, dass nach Zerstörung der Raft-Assoziationsmotive im HA keine großen, stabilisierten Raft-Domänen mehr ausgebildet werden. Weiterhin zeigten Thaa *et al.*²¹⁷, dass die HA-M2-Interaktion stark reduziert ist, wenn beide Raft-Lokalisationsmotive des HA zerstört sind. Die Daten der Clusteranalyse für HA-Cer-VIL3A,C3S (zerstörtes VIL-Motiv und alle drei Acylierungen fehlen) mit M2-YFP-wt der damaligen Studie sind zum Vergleich und mit normierten Akzeptorintensitäten in Abb. 16C gezeigt. Der K_D -Wert beträgt 0,47 und der Kurvenverlauf der Ausgleichsfunktion ist, verglichen mit dem Wildtyp, steiler, was ein reduziertes Clustern anzeigt. Auch die FRET-Effizienz war mit 10,6 %, im Vergleich zum Wildtyp der damaligen Studie ($E=16,3$ %), deutlich reduziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun eine FLIM-FRET-Analyse für HA-Cer-VIL3A bzw. HA-Cer-C3S mit M2-YFP-wt durchgeführt. Die durchschnittliche FRET-Effizienz für HA-Cer-VIL3A + M2-YFP-wt lag bei 7,4 %, leicht reduziert, verglichen mit Experimenten mit HA-Cer-wt (Abb. 16D). Die Clusteranalyse ergab einen relativen K_D -Wert von 0,29 (Abb. 16A). Die durchschnittliche FRET-Effizienz für HA-Cer-C3S + M2-YFP-wt war mit 9,5 % nur geringfügig reduziert gegenüber der für die Wildtypproteine ermittelten (Abb. 16D). Die Clusteranalyse ergab einen relativen K_D -Wert von 0,72 (Abb. 16B), deutlich höher, als in Experimenten mit HA-Cer-wt ($K_D = 0,13$). Die Kurve der Ausgleichsfunktion ist quasi-linear und nicht eher flach, wie es charakteristisch für das Clustern ist. Sie ist zudem, verglichen mit HA-Cer-VIL3A + M2-YFP-wt als auch mit HA-Cer-VIL3A,C3S + M2-

YFP-wt, steiler. Insgesamt sind die FRET-Effizienzen für die gemessenen Kombinationen nur leicht gegenüber denen für Wildtypkonstrukte reduziert (Abb. 16D). Die aus der Clusteranalyse erhaltenen K_D -Werte zeigen jedoch, dass das Clustern zwischen HA und M2 durch die Deletion der HA-Raft-Lokalisationssignale deutlich reduziert ist (eine Zusammenfassung aller K_D -Werte der vorliegenden Arbeit zeigt Abb. 19). Des Weiteren scheinen die beiden Motive nicht additiv zu wirken. Am stärksten ausgeprägt ist der Effekt für nicht-acyliertes HA.

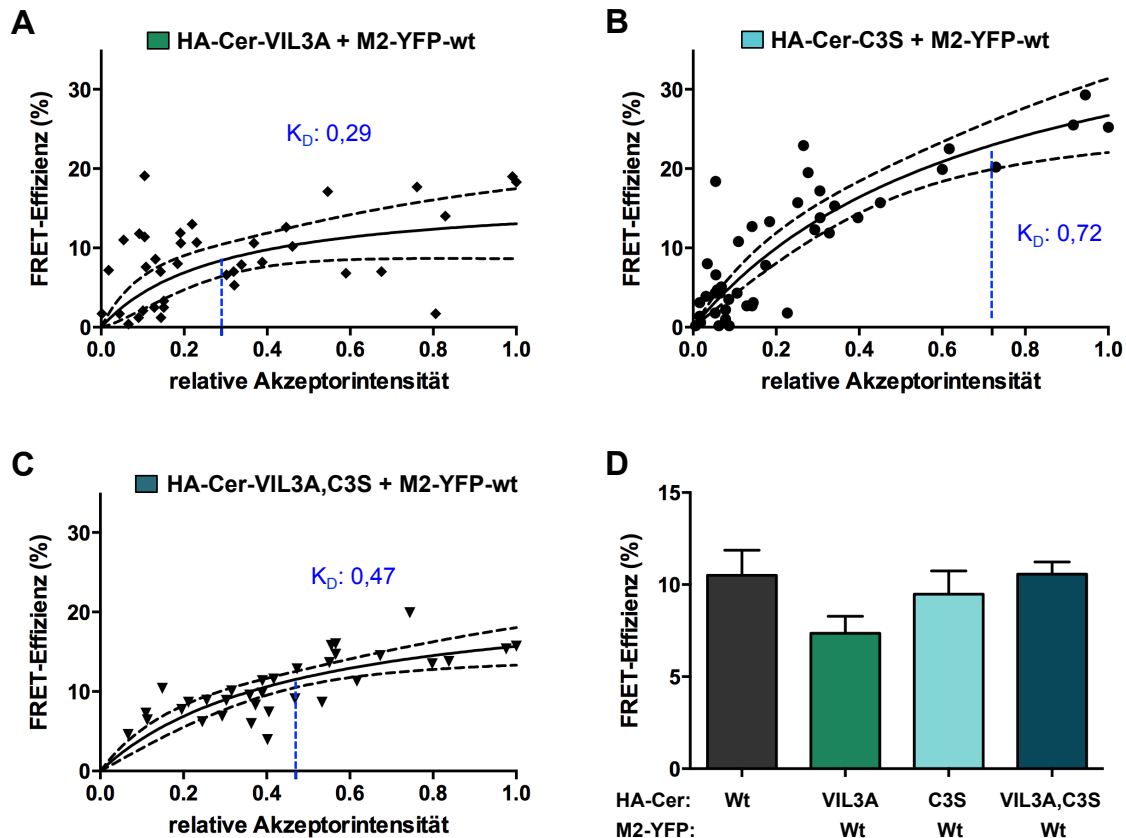


Abb. 16: Das Clustern von HA und M2 ist abhängig von HAs Raft-Lokalisationssignalen. FLIM-FRET-Messungen wurden in CHO-Zellen, die Varianten von HA-Cer und M2-YFP-wt an der Plasmamembran koexprimierten, durchgeführt. **A-C:** Evaluierung des Clusters wie in Abb. 14C. Die K_D -Werte sind viel größer, als der für HA-Cer-wt + M2-YFP-wt, das Clustern ist reduziert. **A:** HA-Cer-VIL3A + M2-YFP-wt, $n = 43$, $E = 7,4 \pm 0,9 \%$, $K_D = 0,29 \pm 0,19$; **B:** HA-Cer-C3S + M2-YFP-wt, $n = 45$, $E = 9,5 \pm 1,3 \%$, $K_D = 0,72 \pm 0,28$; **C:** HA-Cer-VIL3A,C3S + M2-YFP-wt²¹⁷, $n = 33$, $E = 10,6 \pm 0,66 \%$, $K_D = 0,47 \pm 0,18$. Die Daten stammen von mindestens zwei unabhängigen Messtagen. **D:** Darstellung der mittleren FRET-Effizienzen \pm SEM der verschiedenen Messungen.

3.2.2 M2s CRAC-Motive und Acylierung werden nicht für das Clustern mit HA benötigt

In diesem Kapitel wurde die Bedeutung der potenziellen M2-Raft-Lokalisationsmotive für das Clustern mit Wt-HA bestimmt. Einen ersten Hinweis darauf, dass die M2-Motive dafür nicht notwendig sind, lieferte die FLIM-FRET-Messung von HA-Cer-wt mit M2-YFP-Y52S,Y57S (mit zerstörten Cholesterol-Bindemotiven)¹⁰¹. Die Clusteranalyse mit normierten Akzeptorintensitäten ist zum Vergleich in Abb. 17B dargestellt. Der Kurvenverlauf der Ausgleichsfunktion ist eher flach, der relative K_D -Wert beträgt 0,11 und die FRET-Effizienz 9,6 % (verglichen mit 16,6 % des Wildtyps der gleichen Studie), was eindeutig auf eine spezifische Interaktion beider Proteine, trotz zerstörter M2-CRAC-Motive, hindeutet.

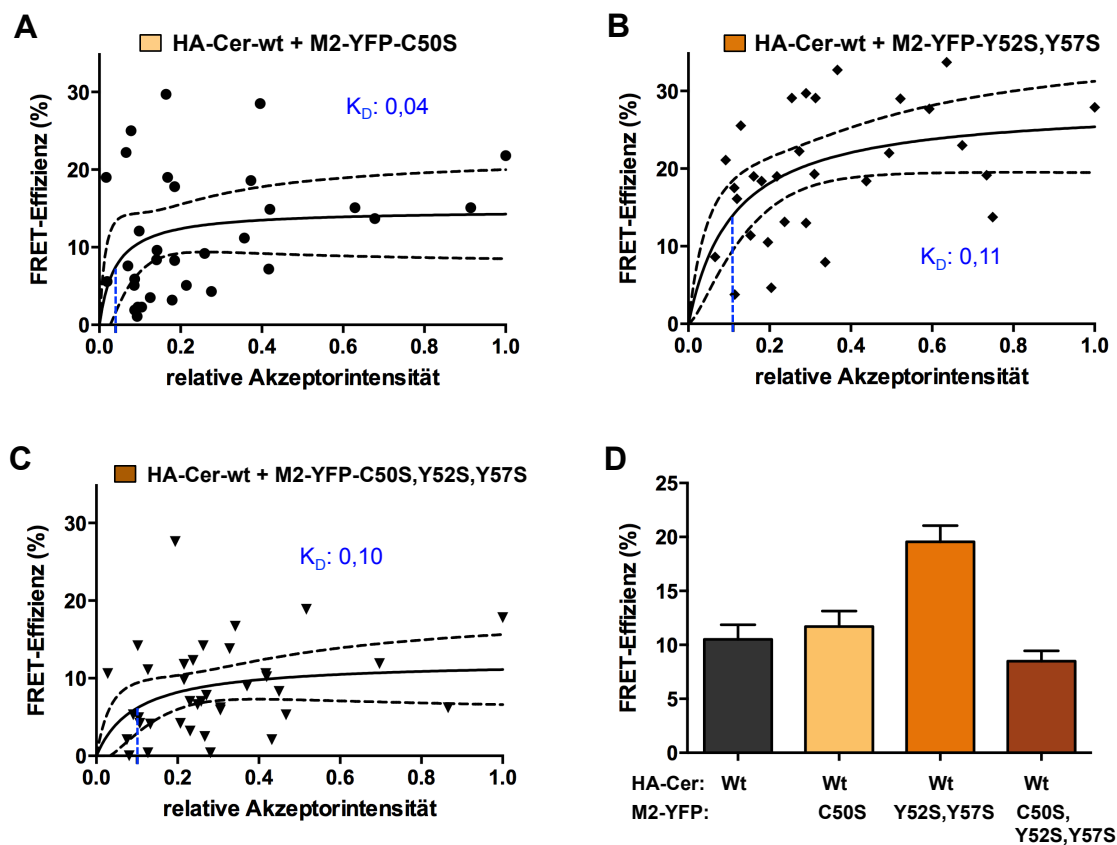


Abb. 17: HA clustert mit M2, unabhängig von dessen Acylierung und CRAC-Motiven. FLIM-FRET-Messungen wurden in CHO-Zellen, die HA-Cer-wt und Varianten von M2-YFP an der Plasmamembran koexprimierten, durchgeführt und die Clusteranalyse wie in Abb. 14C vorgenommen. Die K_D -Werte liegen im gleichen Bereich wie für HA-Cer-wt + M2-YFP-wt, die Proteine clustern. **A:** HA-Cer-wt + M2-YFP-C50S, $n = 32$, $E = 11,7 \pm 1,4 \%$, $K_D = 0,04 \pm 0,04$; **B:** HA-Cer-wt + M2-YFP-Y52S,Y57S¹⁰¹, $n = 30$, $E = 19,6 \pm 1,5 \%$, $K_D = 0,11 \pm 0,06$; **C:** HA-Cer-wt + M2-YFP-C50S,Y52S,Y57S, $n = 37$, $E = 8,5 \pm 1,0 \%$, $K_D = 0,10 \pm 0,10$. Die Daten stammen von mindestens zwei unabhängigen Messtagen. **D:** Darstellung der mittleren FRET-Effizienzen \pm SEM der verschiedenen Messungen.

Die FLIM-FRET-Messungen der vorliegenden Arbeit ergaben für HA-Cer-wt + M2-YFP-C50S (mit fehlender Acylierung) eine FRET-Effizienz von 11,7 %, leicht erhöht gegenüber

der für Experimente mit M2-YFP-wt (Abb. 17D) und einen relativen K_D -Wert von 0,04 (Abb. 17A). Für HA-Cer-wt + M2-YFP-C50S,Y52S,Y57S (beide potenziellen Raft-Assoziationsmotive fehlen) ergab sich eine FRET-Effizienz von 8,5 %, leicht reduziert gegenüber der für HA-Cer-wt + M2-YFP-wt (Abb. 17D) und ein relativer K_D -Wert von 0,1 (Abb. 17C). Für beide Messungen ist die Kurve der Ausgleichsfunktion flach und vergleichbar mit der für Messungen mit M2-YFP-wt erhaltenen Kurve. Auch die relativen K_D -Werte liegen im gleichen Bereich, wie für HA-Cer-wt + M2-YFP-wt (s. Abb. 19). Dies deutet darauf hin, dass HA mit M2 clustert, unabhängig von dessen Acylierung oder Cholesterol-Bindemotiven.

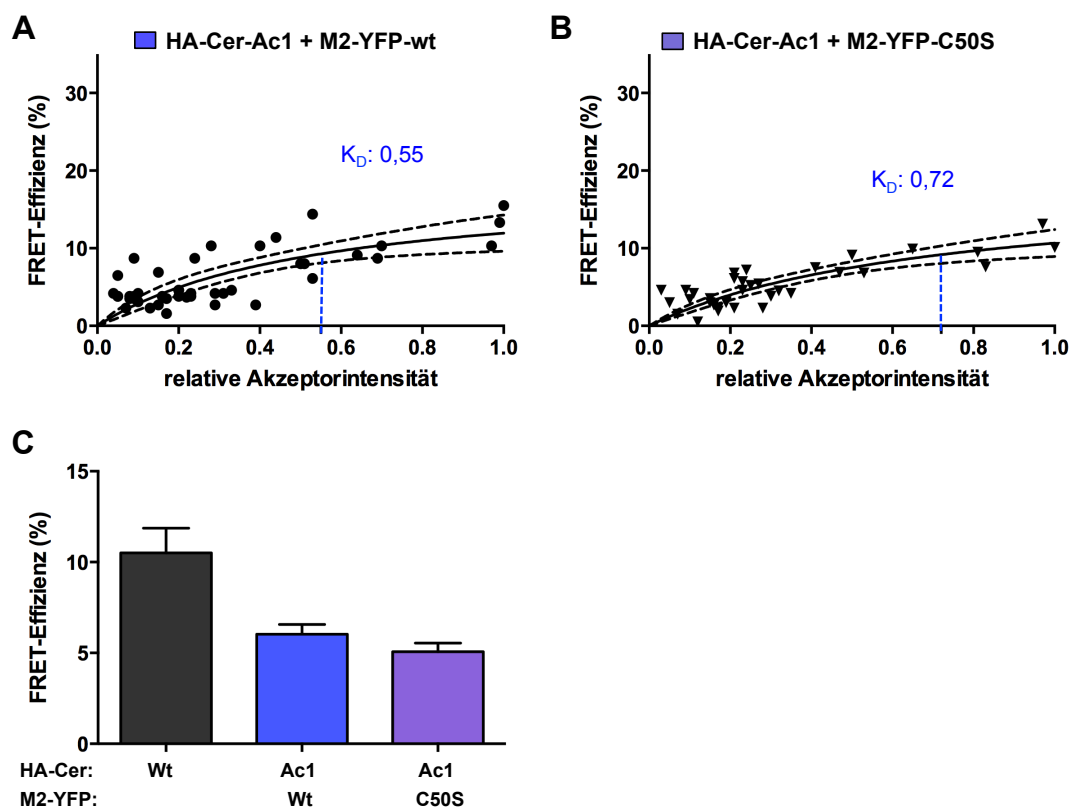


Abb. 18: Leichte Synergie zwischen den Acylierungen von HA und M2. FLIM-FRET-Messungen wurden in CHO-Zellen, die HA-Cer-Ac1 und M2-YFP-wt (**A**) bzw. M2-YFP-C50S (**B**) an der Plasmamembran koexprimierten, durchgeführt und die Clusteranalyse wie in Abb. 14C durchgeführt. Die K_D -Werte sind viel größer, als der für HA-Cer-wt + M2-YFP-wt, was auf ein reduziertes Clustern hinweist. HA-Cer-Ac1 + M2-YFP-wt besitzt einen geringeren K_D -Wert, als HA-Ac1-Cer + M2-YFP-C50S, was auf einen synergistischen Effekt der Acylierung beider Proteine hindeutet. **A:** HA-Cer-Ac1 + M2-YFP-wt, $n = 43$, $E = 6,0 \pm 0,5$ %, $K_D = 0,55 \pm 0,23$; **B:** HA-Cer-Ac1 + M2-YFP-C50S, $n = 36$, $E = 5,1 \pm 0,5$ %, $K_D = 0,72 \pm 0,26$. Die Daten stammen von mindestens zwei unabhängigen Messtagen. **D:** Darstellung der mittleren FRET-Effizienzen \pm SEM der verschiedenen Messungen.

Zuletzt wurden im Hinblick auf die Fragestellung eines möglichen synergistischen Effekts der Acylierung von HA und M2 (Kap. 3.3) FLIM-FRET-Messungen für HA-Cer-Ac1 (fehlende Acylierung am Cys554 der TMD, s. Abb. 20A) mit M2-YFP-wt bzw. M2-YFP-C50S (fehlen-

de Acylierung im M2) durchgeführt. Die FRET-Effizienz für HA-Cer-Ac1 + M2-YFP-wt beträgt 6 %, und ist somit, verglichen mit der für HA-Cer-wt ermittelten, reduziert (Abb. 18C). Der K_D -Wert beträgt 0,55 und der Verlauf der Ausgleichskurve ist deutlich steiler, als für HA-Cer-wt + M2-YFP-wt (Abb. 18A). Bereits das Fehlen einer einzelnen Acylierung im HA führt somit zu einer deutlichen Reduktion des Clusters mit M2. Die FRET-Effizienz für HA-Cer-Ac1 + M2-YFP-C50S ist weiter reduziert, auf 5 % (Abb. 18C) und auch der K_D -Wert liegt etwas höher bei 0,72 (Abb. 18B). Dies könnte auf einen (leichten) synergistischen Effekt der Acylierungen beider Proteine hindeuten, da das Vorliegen von nicht-acyliertem M2 zusätzlich zu unteracyliertem HA eine weitere Reduktion des K_D -Wertes und somit des Clusters herbeiführt. Allerdings sind die Standardfehler der K_D -Mittelwerte relativ hoch (vgl. Abb. 19) und ein Students t-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden K_D -Werten an.

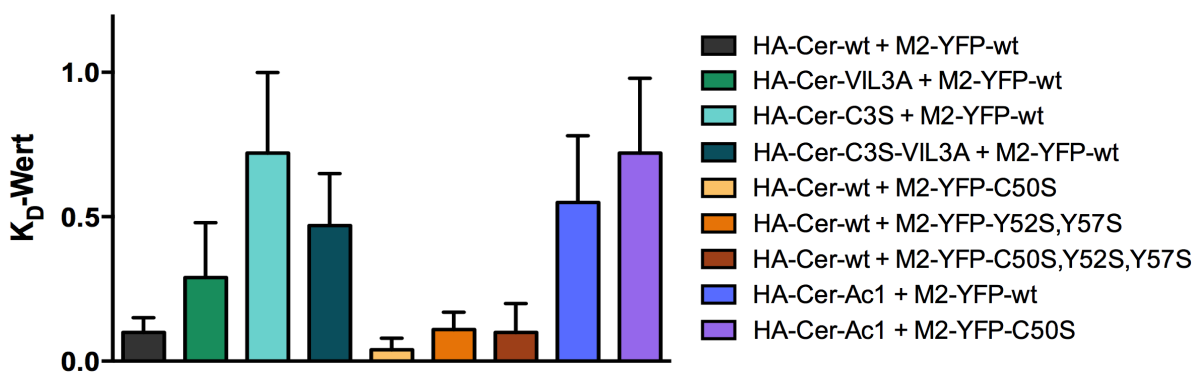


Abb. 19: Zusammenfassung der K_D -Werte der Clusteranalysen. Der K_D -Wert für HA-Raft-Lokalisationsmutanten in Kombination mit M2-Wt ist erhöht, das Clustern somit reduziert. M2-Varianten mit fehlender Acylierung und/oder zerstörten CRAC-Motiven in Kombination mit HA-Wt weisen einen K_D -Wert ähnlich dem des Wildtyps und somit kein reduziertes Clustern auf. Bereits eine fehlende Acylierung in HA (Ac1) in Kombination mit M2-Wt führt zu einer Erhöhung des K_D -Werts und einer Reduktion des Clusters. Dieser Effekt wird durch das zusätzliche Vorliegen von nicht-acyliertem M2 (C50S) verstärkt, was auf eine Synergie der Acylierung von HA und M2 hindeutet. Angegeben ist der K_D -Wert \pm SEM. Die Messwerte für HA-Cer-VIL3A,C3S + M2-YFP-wt und HA-Cer-wt + M2-YFP-Y52S,Y57S stammen aus vorherigen Studien^{101,217}.

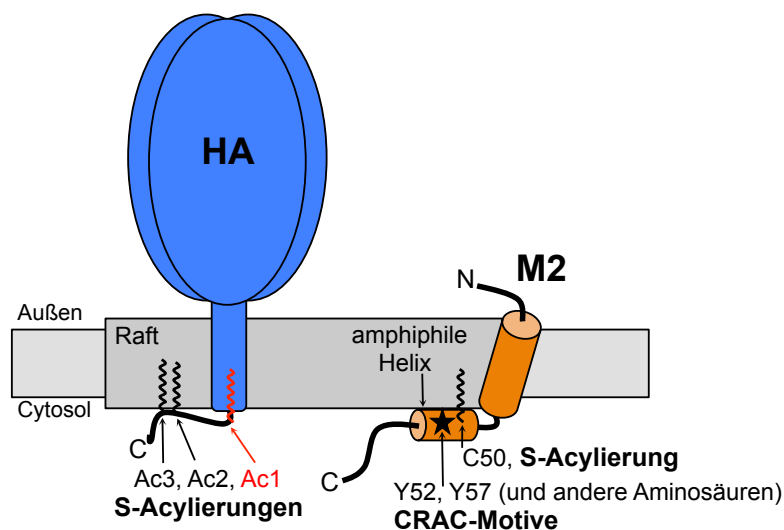
Das folgende Kapitel widmet sich der Frage, ob im viralen Kontext eine Synergie zwischen den Acylierungen des HA und der M2-Acylierung und/oder den M2-Cholesterol-Bindemotiven existiert.

3.3 Untersuchung einer möglichen Synergie zwischen den Acylierungen von HA und M2 im viralen Kontext

Teilergebnisse wurden bereits in Ref. 107 und 262 veröffentlicht.

3.3.1 Herstellung rekombinanter Influenzaviren mit Mutationen in HA und M2

Die FLIM-FRET-Messungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die S-Acylierung und die Cholesterol-Bindemotive des M2 (vgl. Abb. 20A rechts) nicht für das Clustern mit Wt-HA und somit nicht für die Interaktion mit den durch HA gebildeten, stabilisierten Raft-Domänen benötigt werden. Weiterhin treten für M2-Acylierungs sowie für CRAC-Motiv-Mutanten in der Zellkultur keine signifikanten Phänotypen auf^{68,216,220–222} und im Mausmodell beeinträchtigten diese Mutationen nur leicht die Virulenz und Pathogenität der Viren^{220,222}, obwohl diese Mutationen *in vitro* durchaus Effekte zeigen²¹⁸. Die FLIM-FRET-Messungen ergaben auch, dass beide Raft-Lokalisationssignale des HA (vgl. Abb. 20A links) für das Clustern mit Wt-M2 benötigt werden, vermutlich weil diese Motive für die Bildung stabiler Raft-Domänen (mit denen M2 dann interagieren kann) notwendig sind¹⁸⁴ (vgl. Abb. 9). Anders als M2, besitzen HA-Raft-Mutanten meist auffällige Phänotypen^{59,186,187,263}. Da die Knospung von Influenzaviren ein komplexer, redundanter Prozess ist, besteht die Möglichkeit, dass die durch eine fehlende Acylierung und/oder Cholesterol-Bindemotive im M2 bewirkten Effekte durch Wt-HA kompensiert werden können. Erst eine Kombination dieser M2-Varianten mit unteracyliertem HA, welches laut FLIM-FRET-Messung (vgl. Abb. 16) am stärksten das Clustern mit M2 reduziert, könnte dann zu einem detektierbaren Effekt führen. Um dies im viralen Kontext zu untersuchen wurde zunächst versucht, WSN-Viren mit unteracyliertem HA und anschließend Viren mit einer Kombination aus unteracyliertem HA und M2 ohne Acylierung und/oder zerstörten CRAC-Motiven zu generieren. Jeweils eines oder zwei der konservierten, acylierten Cysteine im HA wurden durch Serin ersetzt (vgl. Abb. 20B). Die Konstrukte für Einzelacylierungsmutanten wurden von B. Thaa zur Verfügung gestellt. Die für die Doppelacylierungsmutanten verwendeten Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit erzeugt, wie in Kap. 2.1.2.2 beschrieben. Mittels reverser Genetik basierend auf dem System von Hoffmann *et al.*²²⁶ wurde dann versucht, infektiöse WSN-Viren zu generieren. Dafür wurde das mutationstragende HA-Plasmid zusammen mit sieben Plasmiden, die für die anderen viralen Proteine kodieren, in HEK-293T-Zellen transfiziert und drei Tage später der Überstand per Plaquetest auf MDCKII-Zellen hinsichtlich freigesetzter Viruspartikel überprüft.

A**B**

Mutante	Hämagglutinin (HA)		M2	Virus
	TMD	CP-Bereich	amphiphile Helix	
Wt (WSN)	.. ⁵⁵¹ FWMCS	NGSLQCRICI ⁵⁶⁵ *	.. ⁴⁸ FKCIYRRFKYGLKR ⁶¹ ..	+
HA Ac1 (C554S)	..FWMSS	NGSLQCRICI*	wt	+
HA Ac2 (C561S)	..FWMCS	NGSLQSRICI*	wt	-
HA Ac3 (C564S)	..FWMCS	NGSLQCRISI*	wt	-
HA Ac1,2	..FWMSS	NGSLQSRICI*	wt	-
HA Ac2,3	..FWMCS	NGSLQSRISI*	wt	-
HA Ac1,3	..FWMSS	NGSLQCRISI*	wt	-
HA Ac1 + M2 C50S	..FWMSS	NGSLQCRICI*	..FKSIYRRFKYGLKR..	+
HA Ac1 + M2 Y52S,Y57S	..FWMSS	NGSLQCRICI*	..FKCISRRFKSGLKR..	+
HA Ac1 + M2 C50S,Y52S,Y57S	..FWMSS	NGSLQCRICI*	..FKSISRRFKSGLKR..	+

Abb. 20: Übersicht der hergestellten Viren mit Mutationen in HA und/oder M2. **A:** Schematische Darstellung von HA und M2 und der im Rahmen dieser Arbeit modifizierten Motive. HA interagiert mit Rafts über Acylierungen an drei Cysteinen (gewellte Linien). Nur Viren (WSN) mit fehlender Acylierung an Position 554 (Ac1, rote gewellte Linie) konnten generiert werden. M2 besitzt ebenfalls eine S-Acylierung (gewellte Linie) und des Weiteren CRAC-Motive (Stern). **B:** Vorgenommene Modifikationen in HA und/oder M2. Die C-terminale As-Sequenz von HA (H1-Subtyp) und M2 von WSN ist im (durch hochgestellte Nummern) angegebenen Bereich dargestellt. Die acylierten Cysteine und die zentralen Tyrosine der M2-CRAC-Motive sind grau hinterlegt und wurden in den verschiedenen Mutanten durch Serin (S, fett gedruckt) substituiert. In HA wurden jeweils ein oder zwei der konservierten Cysteine durch Serin ersetzt. Es ist angegeben, ob durch Transfektion von 293T-Zellen rekombinante Viren mit der jeweiligen Mutation generiert werden konnten (+) oder nicht (-). TMD = Transmembrandomäne, * = Stoppkodon

Infektiöse Viren konnten lediglich für an Position 554 (Ac1) nicht-acyliertes HA generiert werden. Bei fehlender Acylierung an Position 561 (Ac2) und 564 (Ac3) sowie für Doppelacylierungsmutanten konnten in fünf Versuchen keine infektiösen Viren generiert werden (vgl. Abb. 20A). Parallel durchgeführte Kontrollexperimente mit dem Wt-HA-Plasmid bestätigten

aber, dass die Transfektion erfolgreich war. Somit sind beide Palmitoylierungsstellen des CP-Bereichs, nicht aber das stearoylierte Cystein am Ende der TMD von H1-Subtyp-HA für die Virusreplikation essenziell. Dies ist im Einklang mit einer früheren Studie, in der ein weniger effizientes reverses Genetiksystem genutzt wurde, und in der die Herstellung infektiöser WSN-Viren nicht möglich war, wenn die cytoplasmatischen Cysteine durch Serin ersetzt wurden²⁶³.

Viren des WSN-Stammes mit nicht-acyliertem M2 und/oder Unterbrechung der CRAC-Motive wurden bereits generiert und charakterisiert²¹⁶. Die gleichen Plasmide wurden folgend verwendet, um in Hinblick auf die Fragestellung einer synergistischen Wirkung zwischen den (potenziellen) Raft-Assoziationsmotiven von HA und M2, Viren herzustellen, die eine Kombination aus unteracyliertem HA (C554S, Ac1) und M2 ohne Acylierung und/oder zerstörten CRAC-Motiven besitzen (Abb. 20B unterer Teil). Für alle Kombinationen von HA Ac1 mit den verschiedenen M2-Varianten konnten infektiöse Viren hergestellt werden. Alle mutationstragenden Viren wurden schließlich für ihre weitere Charakterisierung amplifiziert. Nach jedem Amplifikationsschritt wurde RNA von den Viruspartikeln isoliert, cDNA hergestellt und das Vorhandensein der Mutation per Sequenzierung bestätigt.

3.3.2 Viren mit fehlender Acylierung in HA und M2 wachsen schlechter als Viren, die nur unteracyliertes HA besitzen

Zur Charakterisierung der Mutanten hinsichtlich ihres Wachstums, wurden MDCKII-Zellen mit einer kleinen m.o.i. (*multiplicity of infection*, das Verhältnis der Anzahl infektiöser Viren zu Wirtszellen) von 0,001 mit dem entsprechenden Virus infiziert. Die initial infizierten Zellen setzen neue Viren frei, die wiederum neue Zellen der gleichen Kultur infizieren, so dass mehrere virale Replikationszyklen durchlaufen werden und man eine mehrstufige Wachstumskurve erhält. Dies bietet den Vorteil, dass auch geringe, durch die Mutationen hervorgerufene Effekte, die sich mit jedem Zyklus amplifizieren, sichtbar werden. Des Weiteren können Defekte in der Fähigkeit, sich von Zelle zu Zelle zu verbreiten, erkannt werden. Der Virustiter im Zellkulturüberstand wurde zu definierten Zeitpunkten per Plaquetest ermittelt.

Die Wachstumskurven für Viren mit unteracyliertem HA in Kombination mit Wt-M2 (HA Ac1) oder nicht-acyliertem M2 (HA Ac1 + M2 C50S), im Vergleich zu Viren mit Wt-HA mit nicht-acyliertem M2 (M2 C50S) oder mit Wt-M2 (Wt), zeigt Abb. 21A. Während M2 C50S-Viren, verglichen mit Wt-Viren, eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion im Wachstum zeigen, weisen HA Ac1-Viren einen Unterschied von etwa einer Titerstufe im Vergleich zum Wildtyp auf. Auch in vorherigen Arbeiten war das Wachstum von HA Ac1-

Viren des gleichen Stammes (WSN, H1-Subtyp-HA)²⁶³, oder von Geflügelpestviren (H7-Subtyp-HA)¹⁸⁶, nur geringfügig gegenüber dem Wachstum von Wt-Viren reduziert. Das Wachstum der M2 C50S-Viren stimmt mit dem Ergebnis einer vorherigen Studie überein, in der M2 C50S-WSN-Viren charakterisiert wurden²¹⁶.

Eine weitere Verschlechterung des Wachstums, verglichen mit HA Ac1-Viren, weisen Viren auf, denen neben einer Acylierung im HA zusätzlich die Acylierung im M2 fehlt (HA Ac1 + M2 C50S). Die Replikation dieser Viren beginnt stark verzögert und über den gesamten Beobachtungszeitraum liegt ein, verglichen mit Wt-Viren um etwa zwei Titerstufen (d. h. 100 fach) und verglichen mit HA Ac1-Viren ein um etwa eine Titerstufe, reduziertes Wachstum vor. Das verminderte Wachstum von HA Ac1 sowie HA Ac1 + M2 C50S spiegelt sich auch in der Größe der gebildeten Plaques wieder (Abb. 21C). Diese sind bereits für M2 C50S-Viren kleiner als bei dem Wildtyp. Eine weitere Größenreduktion der Plaques ist für HA Ac1-Viren erkennbar. Die Doppelmutante HA Ac1 + M2 C50S weist ebenfalls viel kleinere Plaques als der Wildtyp auf, die Plaquegröße ist jedoch vergleichbar mit der von HA Ac1-Viren. Um auszuschließen, dass beobachtete Effekte durch Sekundärmutationen in anderen Genomsegmenten entstanden sind, wurde die Wachstumskurve für HA Ac1- und HA Ac1 + M2 C50S-Viren mit neu generierten Virusstocks wiederholt. Auch wurde die Präsenz der gewünschten Mutation in den Viren am Ende der Wachstumskurve durch eine erneute Sequenzierung verifiziert.

Es wurden auch Viren mit einer Kombination von HA Ac1 und der M2-CRAC-Motiv-Mutante (HA Ac1 + M2 Y52S,Y57S) sowie mit der M2-Doppelmutante (HA Ac1 + M2 C50S,Y52S,Y57S) hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer Plaquegröße charakterisiert (Abb. 21B und C). Diese verhielten sich aber vergleichbar wie HA Ac1-Viren.

Zusammengefasst führt in Viren mit unteracyliertem HA (Ac1) das zusätzliche Fehlen der Acylierung (nicht aber der CRAC-Motive oder Acylierung plus CRAC-Motive) in M2 zu einer weiteren Reduktion des Virenwachstums, was auf eine funktionelle Kopplung der Acylierung von HA und M2 hindeutet.

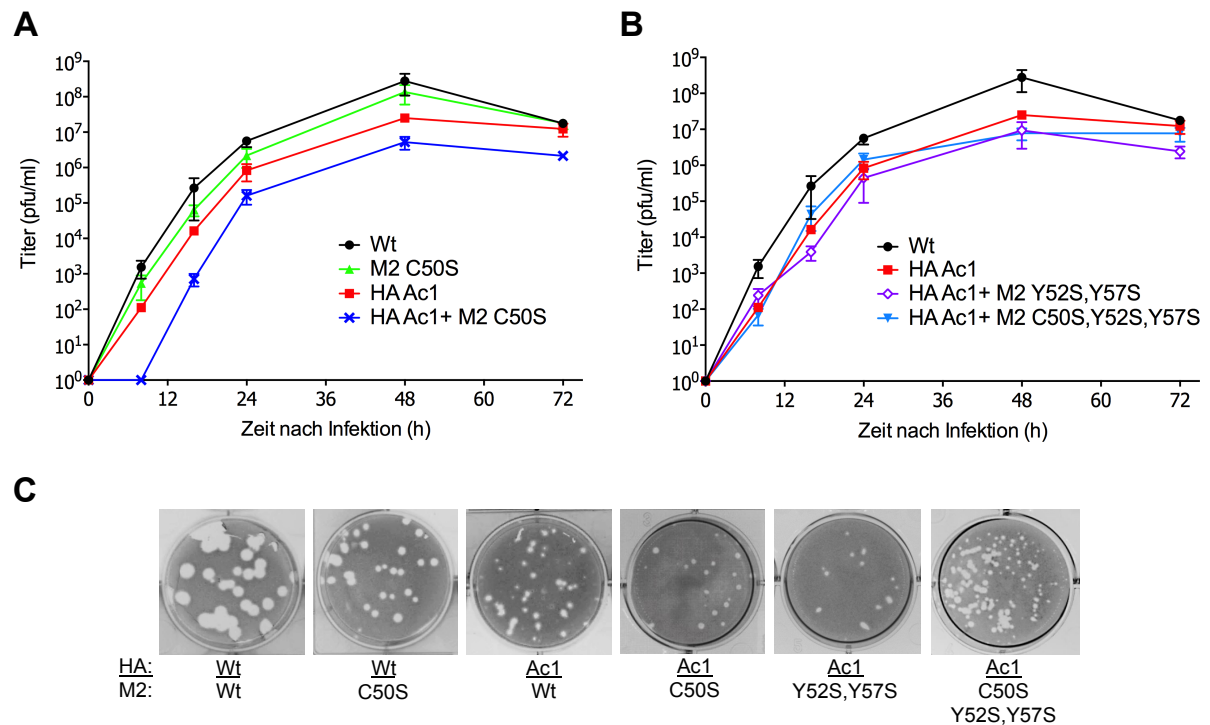


Abb. 21: Zwischen der Acylierung von HA und M2 existiert ein synergistischer Effekt. A, B: MDCKII-Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,001 mit den angegebenen Viren (WSN) infiziert. Aliquots wurden 8, 16, 24, 48 und 72 h nach der Infektion entnommen und der Titer per Plaquetest bestimmt. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt, gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM. pfu = Plaque-bildende Einheiten. **C:** Repräsentative Plaquetests von Wt und Viren mit den genannten Mutation in HA und/oder M2. Die Plaquetests wurden parallel durchgeführt und 72 h nach der Infektion dokumentiert.

Da HA Ac1-Viren und die Doppelmutante HA Ac1 + M2 C50S ein reduziertes Wachstum aufweisen, wurde in einem nächsten Experiment untersucht, ob die Mutationen über einige Viruspassagen stabil sind, oder ob durch einen erhöhten Selektionsdruck Rück- oder Sekundärmutationen der modifizierten Kodons entstehen. In Influenzaviren können sich prinzipiell relativ schnell, innerhalb weniger Vermehrungszyklen, neue Mutationen im Genom etablieren. Dies liegt darin begründet, dass das virale Genom aus einzelsträngiger RNA besteht, bei deren Vervielfältigung mechanismusbedingt mehr Mutationen entstehen, als es bei der Replikation von DNA der Fall ist. Bei der Konstruktion der Mutationen wurden daher stets mindestens zwei Nukleotide im betreffenden Aminosäurekodon modifiziert, um der Reversion zur Wildtypsequenz entgegen zu wirken. Für das Experiment wurden Schälchen konfluenter MDCKII-Zellen mit den jeweiligen Viren infiziert, der Überstand nach 24 h geerntet und wiederum für die Infektion neuer Zellen eingesetzt. Nach achtmaliger Passage wurde durch Sequenzierung überprüft, ob die ursprünglichen Mutationen noch vorhanden waren. Abb. 22 zeigt die Sequenzchromatogramme: Die Mutationen in der Einzel- als auch der Doppelmutante sind über mindestens acht Passagen stabil.

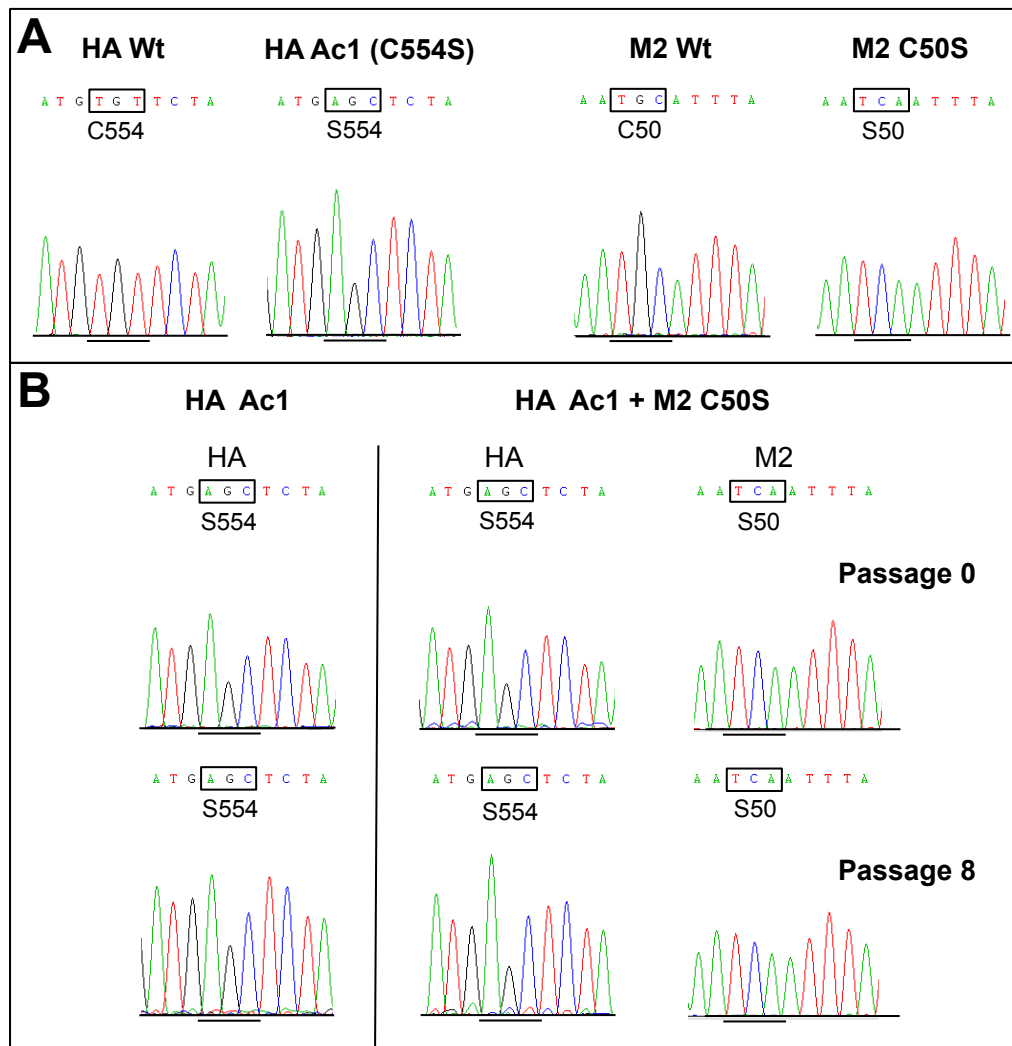


Abb. 22: HA Ac1-Viren und HA Ac1 + M2 C50S-Viren sind über acht Passagen stabil. MDCKII-Zellen eines 6 cm-Schälchens wurden mit einer m.o.i. von 0,01 der genannten Viren infiziert und nach 24 h der von Zelltrümmern gereinigte Überstand zur Infektion eines neuen Schälchens MDCKII-Zellen eingesetzt. Dieser Prozess wurde acht mal wiederholt und anschließend aus dem nach der letzten Infektion gewonnenen Überstand die vRNA isoliert, eine RT-PCR durchgeführt und die resultierende cDNA sequenziert. Die Kodons für das acylierte Cystein bzw. das substituierte Serin sind in der Sequenz eingerahmt und im Chromatogramm unterstrichen. Die kodierte As und ihre Position in der Proteinsequenz sind angegeben. **A:** Sequenzchromatogramm der cDNA für Wt-HA und -M2 sowie für die Acylierungsmutanten HA Ac1 und M2 C50S. **B:** Sequenzchromatogramm der cDNA der Mutanten vor (Passage null) und nach acht Passagen.

Ein weiteres Experiment sollte klären, ob die Fitness der Mutanten gegenüber dem Wildtypvirus reduziert ist, d. h. ob dieser einen Selektionsvorteil besitzt. Hierfür wurden MDCKII-Zellen mit einer kleinen m.o.i. der HA Ac1- bzw. HA Ac1 + M2 C50S-Viren und Wildtypviren koinfiziert und die im Zellkulturüberstand enthaltenen Viren 24 und 48 h nach der Infektion (h.p.i., *hours post-infection*) sequenziert. Abb. 23 zeigt die Sequenzchromatogramme im relevanten Bereich von HA bzw. M2 zu den genannten Zeitpunkten nach der Infektion und für die zwei Koinfektionsverhältnisse (Wt : Mutante) von 1:1 (Abb. 23A) bzw. 1:5 (Abb. 23B).

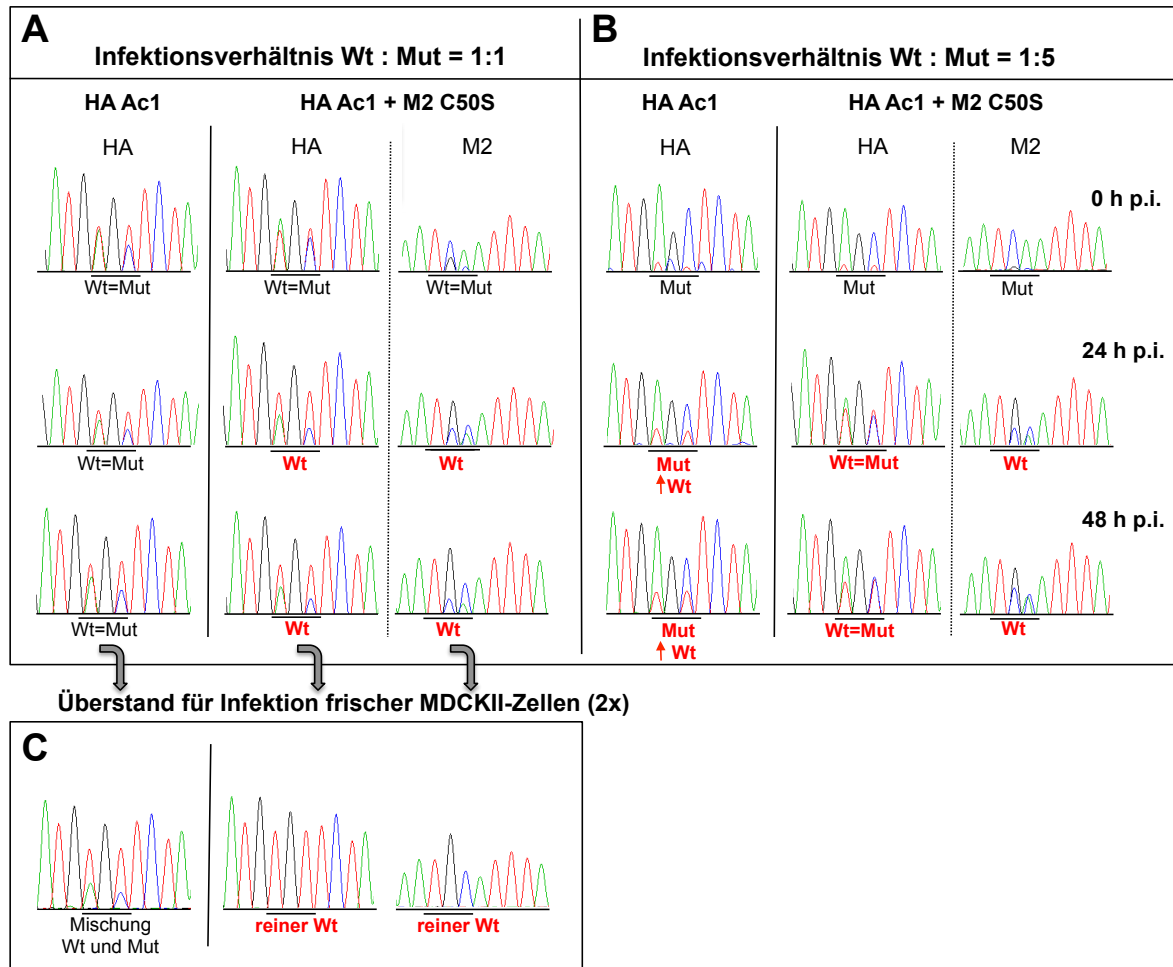


Abb. 23: Die Fitness von HA Ac1-Viren ist leicht, die von HA Ac1 + M2 C50S-Viren stärker beeinträchtigt. MDCKII-Zellen eines 6 cm-Schälchens wurden mit einer m.o.i. von 0,001, mit einem Gemisch aus Wt-WSN (Wt) und Viren mit genannter Mutation (Mut) im Verhältnis von 1:1 (A) oder 1:5 (B), infiziert. Eine Probe vom Überstand wurde 0, 24 und 48 h.p.i. genommen, die virale RNA isoliert, eine RT-PCR durchgeführt und die resultierende cDNA sequenziert (reine Sequenzchromatogramme für Wt sowie die Mutanten sind in Abb. 22A dargestellt). Die Chromatogramme des interessierenden Bereiches zu den verschiedenen Zeitpunkten sind gezeigt. Für HA Ac1-Viren wurde nur HA, für die Doppelmutante (HA Ac1 + M2 C50S) zusätzlich M2 sequenziert, die Chromatogramme sind durch eine gestrichelte Linie separiert. Das für die Mutation relevante Kodon ist unterstrichen und darunter angegeben, welches die dominierende Virusvariante im gezeigten Chromatogramm ist, ob etwa gleiche Mengen vorliegen (Wt=Mut), oder ob die Mutante zwar dominiert, aber die Menge an Wt im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt zugenommen hat (Mut ↑ Wt). Signifikante Änderungen der Zusammensetzung verglichen mit dem Zeitpunkt null sind rot hervorgehoben. C: Mit dem aus der Infektion Wt:Mut (1:1) nach 48 h resultierenden Überstand wurden frische MDCKII-Zellen infiziert, der Überstand nach 24 h geerntet und erneut zur Infektion frischer MDCKII-Zellen eingesetzt, nach wiederum 24 h wurden die Viren im Zellkulturüberstand sequenziert. Die resultierenden Sequenzchromatogramme sind dargestellt. HA Ac1 + M2 C50S-Viren werden vollkommen vom Wildtyp überwachsen.

In allen Koinfektionen waren 48 h.p.i. sowohl Mutanten- als auch Wt-Viren vorhanden. Keine Mutation ist also so gravierend, als das sie komplett vom Wildtyp „überwachsen“ wird. Auch wenn Unterschiede der Peakhöhen und Flächen im Chromatogramm nicht exakt quantitativ gewertet werden können, so liefern sie dennoch eine Information über den ungefähren Anteil von Wildtyp und Mutante in der sequenzierten Probe. Die Einzelmutante HA Ac1 scheint dem Wildtyp gegenüber kaum benachteiligt zu sein. Bei einem Infektionsverhältnis von 1:1

sind auch nach 48 h noch etwa gleiche Anteile von Wildtyp und Mutante im Zellkulturüberstand nachweisbar (Abb. 23A links). Bei einer Infektion im Verhältnis 1:5 (Wt : Mut) macht der Wildtyp nach 48 h knapp ein Drittel der vorhandenen Viren aus, was auf einen leichten Wachstumsvorteil gegenüber der Mutante hindeutet (Abb. 23B links). Die Doppelmutante HA Ac1 + M2 C50S hingegen ist schon bei einem Infektionsverhältnis von 1:1 gegenüber dem Wildtyp klar benachteiligt. Nach 48 h ist der Wildtyp eindeutig die vorherrschende Form (Abb. 23A rechts). Noch deutlicher wird dies bei einem Infektionsverhältnis von 1:5 (Wt : Mut). Während im für die Infektion verwendeten Überstand die Wt-Sequenz nur durch einen sehr kleinen Peak repräsentiert wird, liegen bereits 24 h.p.i. etwa gleich große Mengen Wildtyp und Mutante vor (Abb. 23B rechts). Der Wildtyp besitzt somit eine nennenswert größere Fitness als die Doppelmutante. Nutzt man 48 h.p.i. die Überstände von der Infektion im 1:1 Verhältnis zur Infektion frischer MDCKII-Zellen und gibt nach 24 h den daraus gewonnen Überstand wiederum auf neue MDCKII-Zellen, so liegt nach weiteren 24 h für die Mischung aus HA Ac1- und Wt-Viren immer noch eine Mischung vor, wohingegen HA Ac1 + M2 C50S-Viren komplett vom Wildtyp überwachsen werden (Abb. 23C). Insgesamt stehen diese Ergebnisse im Einklang mit denen der Wachstumsanalyse und deuten ebenfalls auf eine Synergie zwischen den Acylierungen von HA und M2 hin: Die Einzelmutante HA Ac1 besitzt nur einen leichten Wachstumsdefekt und eine leicht reduzierte Fitness gegenüber dem Wildtyp, wohingegen die Doppelmutante HA Ac1 + M2 C50S deutlich schlechter wächst und eine signifikant reduzierte Fitness besitzt.

Die Ursache für das schlechtere Wachstum von HA Ac1 und HA Ac1 + M2 C50S-Viren könnte in einem Defekt bei der Assemblierung und Knospung begründet sein, denn dafür sind Raft-Signaturmotive wie Acylierungen oft von Bedeutung (vgl. Kap. 1.2.3). Da Viren mit solchen Defekten oft eine vom Wildtyp verschiedene Morphologie aufweisen⁵⁴, wurde dies im folgenden Kapitel untersucht.

3.3.3 Die Morphologie der Mutanten ähnelt der von Wildtypviren

Um die Morphologie der Viruspartikel zu untersuchen, wurden diese aus dem Überstand infizierter MDCKII-Zellen pelletiert und mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit Negativkontrast visualisiert (Abb. 24). Sowohl Wildtyp, als auch die Viruspartikel beider Mutanten waren überwiegend sphärisch. Jedoch war die Menge filamentöser Partikel, die stets auch in Wildtyppräparaten vorliegen, für die Mutanten leicht erhöht. Insbesondere für HA Ac1 + M2 C50S-Viren wurden vermehrt perlenkettenartige Gebilde gefunden, die zeigen, dass die finale Abschnürung der Viren von der Wirtszelle beeinträchtigt ist (Abb. 24B). Somit

könnte die Reduktion des Wachstums für HA Ac1 und besonders für HA Ac1 + M2 C50S-Viren durch eine Störung des Knospungs- und Abspaltungsprozesses von der Wirtszelle begründet sein. Allerdings ist der Defekt nur ein sehr schwacher, schwer zu quantifizierender. Die Mutanten HA Ac1 + M2 Y52S,Y57S und HA Ac1 + M2 C50S,Y52S,Y57S lieferten ähnliche Bilder, wie HA Ac1-Viren (nicht gezeigt).

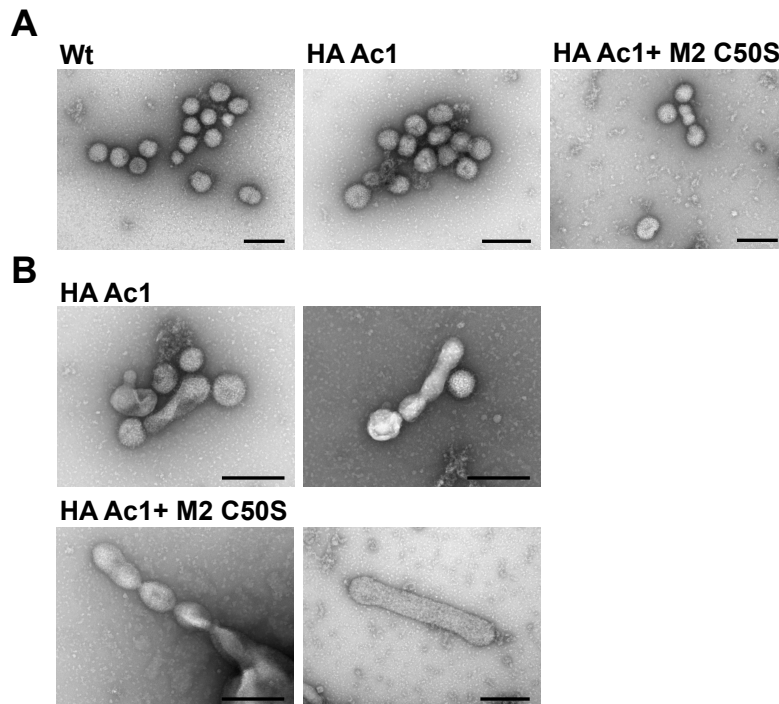


Abb. 24: TEM-Charakterisierung von WSN-Wt, HA Ac1 und HA Ac1 + M2 C50S-Viren. A: Repräsentative negativgefärbte Bilder der jeweiligen Viren, gewonnen aus dem Überstand infizierter MDCKII-Zellen. B: Filamentöse und aberrant geformte Partikel sind auch in Wt-Präparationen zu finden, aber für die Mutanten HA Ac1 und HA Ac1 + M2 C50S wurden, verglichen mit dem Wt, etwas mehr filamentöse Formen, für HA Ac1 + M2 C50S vermehrt auch perlenschnurartige Gebilde, in den Präparationen vorgefunden. Maßstab = 200 nm.

3.3.4 Die Viruspartikelzusammensetzung der Mutanten ist nicht signifikant verändert

Defekte bei der Virusassemblierung manifestieren sich oft in einer veränderten Proteinzusammensetzung. Solche Defekte könnten zum Beispiel die Folge einer reduzierten Interaktion der mutationstragenden Proteine mit den Membran-Rafts der Knospungszone oder mit anderen viralen Proteinen sein, z.B. mit dem Matrixprotein M1, mit dem HA und M2 im Zuge der Knospung interagieren. Um die Hauptstrukturproteine in den Viruspartikeln zu quantifizieren wurden MDCKII-Zellen mit einer m.o.i. von vier mit Wildtypviren bzw. den entsprechenden Mutanten infiziert und die Zellen für drei Stunden mit [³⁵S]-Methionin/Cystein markiert. Nach 16 h wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zelltrümmer entfernt und die pel-

letierten Viren einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE mit anschließender Fluorographie unterworfen. Abb. 25A zeigt die Spuren von sieben verschiedenen Wt-Viruspräparationen auf gescannten Röntgenfilmen, als Banden sichtbar sind die drei Hauptstrukturproteine HA (77 kDa), NP (50 kDa) und M1 (27 kDa).

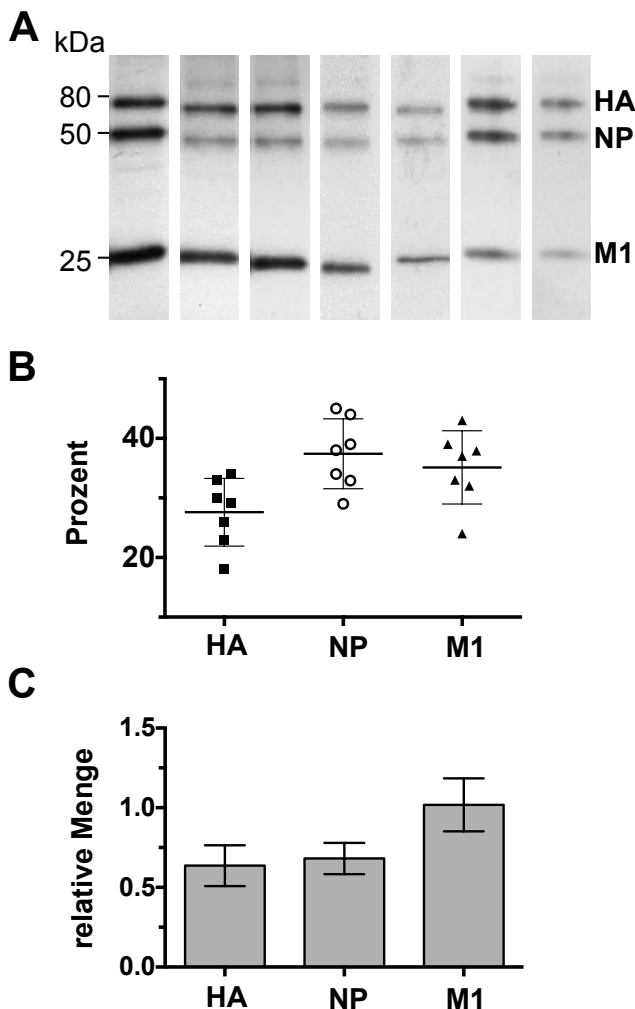


Abb. 25: Varianz der Proteinzusammensetzung verschiedener Wildtyp-Viruspräparationen.

MDCKII-Zellen, infiziert mit Wt-Virus mit einer m.o.i. von vier wurden metabolisch mit [35 S]Met/Cys markiert. Nach 16 h wurden die Viruspartikel vom klaren Zellkulturüberstand pelettiert und einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE und Fluorographie unterworfen. **A:** Fluorogramme sieben verschiedener Viruspräparationen. **B:** Die Intensität der Banden wurde per Densitometrie an gescannten Fluorographiefilmen bestimmt. Der Anteil der drei Hauptproteine wurde ermittelt und ist für jede Viruspräparation gezeigt. Das arithmetische Mittel und die Standardabweichung (SD) sind durch Balken dargestellt. **C:** Die Bandenintensitäten wurden durch die Anzahl der Cysteine und Methionine der Proteine dividiert und auf M1 normiert.

Die Intensitäten der einzelnen Banden wurden per Densitometrie quantifiziert, die Summe der Intensitäten aller drei Proteine einer jeden Gelspur wurde gleich 100 % gesetzt (Abb. 25B). Zwischen verschiedenen Viruspräparationen tritt eine beachtliche Variabilität der relativen Proteinanteile auf. So variiert der Anteil von NP zwischen 28 % und 45 %, der von HA zwischen 18 % und 35 % und der von M1 zwischen 25 % und 42 %. Um die Menge der Proteine abschätzen zu können, wurden die Bandenintensitäten durch die Summe der Methionine und Cysteine des jeweiligen Proteins dividiert und auf M1 normiert (Abb. 25C). Der resultierende Graph zeigt, dass M1 das am stärksten vertretene Protein in Wt-Viruspartikeln ist, was den Schätzungen von Hutchinson *et al.*²⁶⁴ entspricht. Die relative Menge von NP und HA beträgt

Färbung für den gleichen Virusstamm geschätzt wurde²⁶⁵.

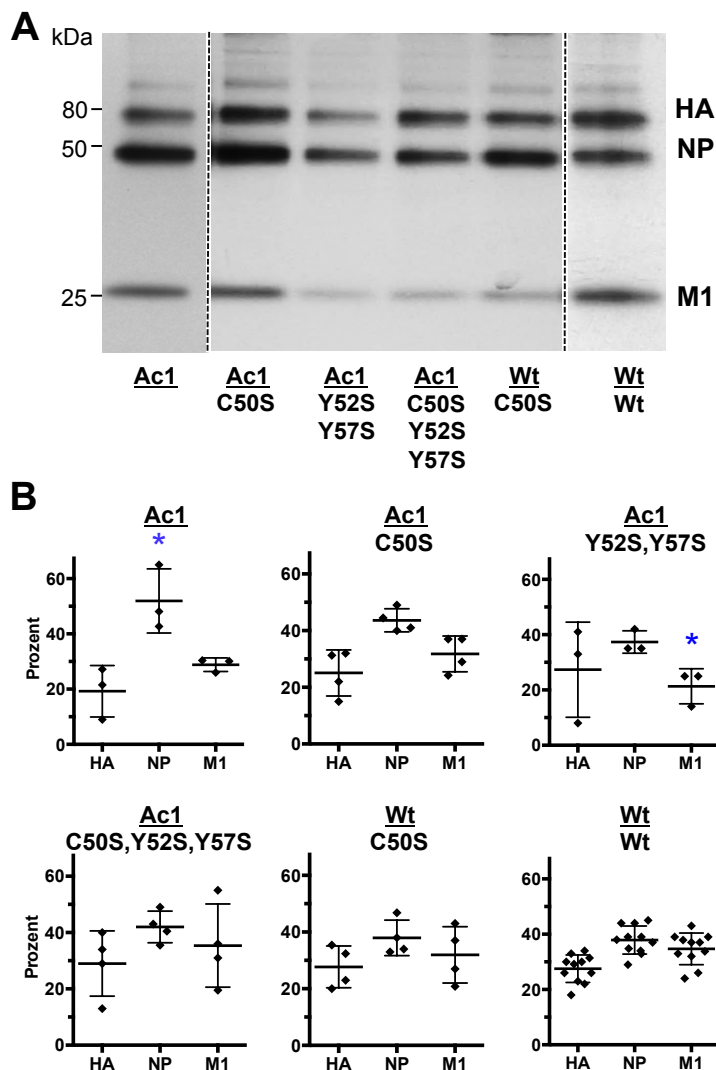


Abb. 26: Die Proteinzusammensetzung von Viruspartikeln mit Mutationen in HA und/oder M2 weist zwischen verschiedenen Präparationen eine starke Varianz auf. MDCKII-Zellen wurden mit einer m.o.i. von zwei der jeweiligen Viren infiziert und metabolisch mit [³⁵S]Met/Cys markiert. Nach 16 h wurden die Viruspartikel vom klaren Zellkulturüberstand pellettiert und einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE und Fluorographie unterworfen. **A:** Gescannter Fluorographiefilm. Gestrichelte Linien trennen Banden desselben Films mit veränderter Expositionszeit. **B:** Die Menge der drei Hauptproteine wurde wie in Abb. 25 bestimmt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von mindestens drei unabhängigen Virusinfektionen. Eine Varianzanalyse (ANOVA) und Students t-Test (ungepaart, zweiseitig) zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der meisten Mutanten und Wt-Viruspartikeln. Signifikant verschieden vom Wildtyp: * = $P < 0,05$.

Auf ähnliche Weise wurde dann die Proteinzusammensetzung für drei oder vier [³⁵S]-markierte Viruspräparationen jeder Mutante ermittelt (Abb. 26). Der größte Unterschied zum Wildtyp ist die teilweise sehr starke Variabilität in der Proteinzusammensetzung vieler Mutanten. Besonders auffällig ist dies für HA Ac1 + M2 Y52S,Y57S und HA Ac1 + M2 C50S,Y52S,Y57S-Viren, in denen der Anteil von HA zwischen 8 % und 41 % bzw. von M1 zwischen 20 % und 55 % variiert (Abb. 26B). In der Mutante HA Ac1 ist die Tendenz einer reduzierten HA- und M1-Menge erkennbar. Die HA-Menge ist möglicherweise auch in den anderen Viren mit der HA Ac1-Mutation reduziert, allerdings ist die Varianz zu groß, als dass eine klare Aussage getroffen werden könnte. Laut t-Test besitzt die Mutante HA Ac1 zudem eine signifikant erhöhte NP-Menge. Es ist aber möglich, dass die reduzierte HA- und

Legende:
(Mutationen in) HA
 (Mutationen in) M2

M1-Mengen zu einer scheinbaren Erhöhung des NP-Anteils führen. Eine signifikant veränderte NP-Menge liegt in keiner anderen Mutante vor. Auch die M1-Menge ist laut t-Test nur in der Mutante HA Ac1 + M2 Y52S,Y57S signifikant verschieden (verringert). Dies könnte jedoch auch ein, durch den breiten Varianzbereich der HA-Menge in dieser Mutante, verfälschtes Resultat sein. Die Zusammensetzung von Wt-HA + M2 C50S-Viren ist vergleichbar mit der des Wildtyps. Zusammenfassend lassen sich mit dieser Methode für die verschiedenen Mutanten, verglichen mit dem Wildtyp, keine eindeutig signifikanten Unterschiede der Proteinzusammensetzung ausmachen. Dies ist der starken Variabilität der Proteinzusammensetzung verschiedener Präparationen der Mutanten geschuldet.

Für einen weiteren Vergleich der Proteinzusammensetzung der Mutanten mit der des Wildtyps wurde auch das Verhältnis von HA zu M1 in den Viruspartikeln bestimmt. Da M1 vermutlich über den CP-Bereich von HA zur Knospungszone rekrutiert wird¹⁸⁷, könnte die inkorporierte M1-Menge in Viren mit mutationstragendem HA reduziert sein. Zellkulturüberstände infizierter MDCKII-Zellen wurden auf einen HA-Titer von 2^6 eingestellt und Aliquots einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit polyklonalem Antiserum gegen Geflügelpestvirus, welches mit WSN-M1 kreuzreagiert, unterworfen (Abb. 27A.). Die Quantifizierung erfolgte über die Detektion der Chemilumineszenz-Signalintensitäten der M1-Banden von drei verschiedenen Virusinfektionen, die auf den Wildtyp normiert wurden (Abb. 27B). Die Mutante HA Ac1 besitzt einen relativ zu HA leicht erhöhten M1-Gehalt. Allerdings ist der Mittelwert statistisch nicht signifikant verschieden vom Wildtyp. Die restlichen Mutanten weisen eine mit dem Wildtyp vergleichbare M1-Menge auf.

Das Protein M2 ist für die Assemblierung und Knospung von Influenzaviren von großer Bedeutung. Es wird über die Wechselwirkung seines C-terminalen Bereiches mit M1 zur Knospungszone rekrutiert⁵⁵. Die Acylierung und/oder die Cholesterol-Bindemotive von M2 könnten für die korrekte Lokalisation im Zuge der Knospung wichtig sein und Mutationen dieser Motive somit den M2-Gehalt in Viruspartikeln beeinflussen. Hinweise dafür lieferte die Studie von Thaa *et al.*²¹⁶. Da M2 nur in sehr geringen Mengen in Viren vorliegt, ist es nicht per Fluorographie visualisierbar. Zur Quantifizierung des M2-Gehalts in den Mutanten wurden die Zellkulturüberstände infizierter MDCKII-Zellen auf einen HA-Titer von 2^7 eingestellt und parallel ein Western Blot für M1 und mit dem M2-spezifischem Antikörper „14C2“ für dieselben Proben durchgeführt (Abb. 27C).

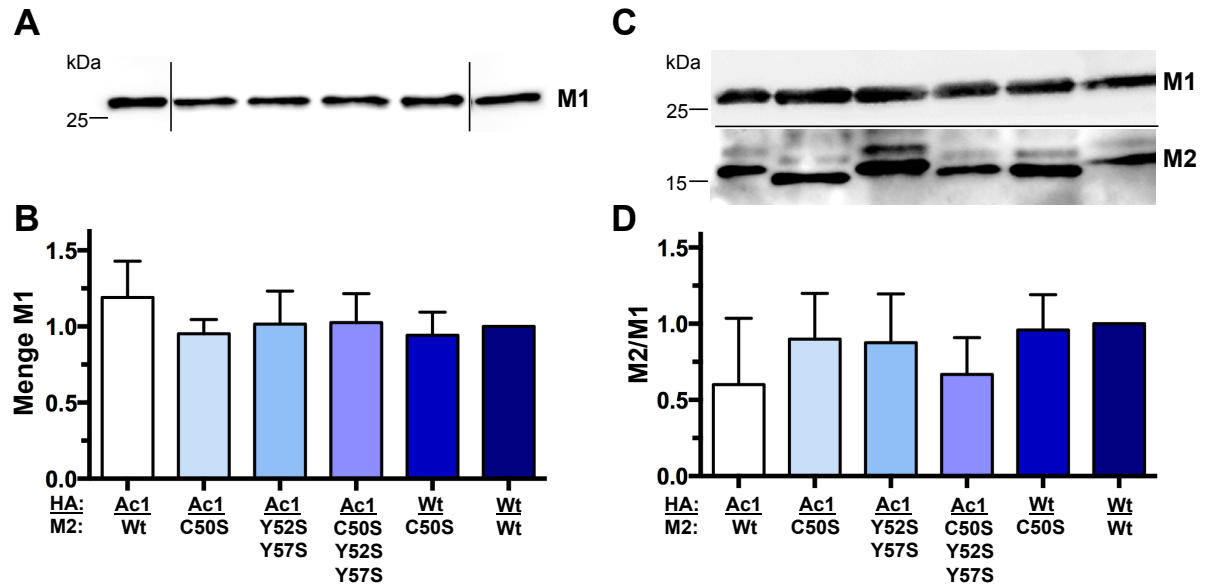


Abb. 27: Der M1- und M2-Gehalt ist in Viruspartikeln mit Mutationen in HA und/oder M2 nicht verändert. MDCKII-Zellen wurden mit einer m.o.i. von eins infiziert. Nach 24 h wurde der Zellkulturüberstand geerntet, der HA-Titer bestimmt und die Viren direkt (**A**, **B**) oder nach dem Pelletieren (**C**, **D**) in einer reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt und M1 und M2 per Western Blot detektiert sowie über das Chemilumineszenzsignal quantifiziert. **A**: M1-Western Blot (Anti-KP-Antiserum) für Proben eines HA-Titers von 2^6 . Durchgezogene Linien zwischen Spuren trennen verschiedene Blots. **B**: Quantifizierung des M1-Gehalts aus drei unabhängigen Virusinfektionen. Dargestellt sind die auf den Wt normierten Mittelwerte \pm SD. Ein t-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede im HA/M1-Verhältnis zwischen Wt- und Mutanten. **C**: M1 und M2-Western Blot (Anti-M2-14C2) für Virusproben mit einem HA-Titer von 2^7 . **D**: M2-Gehalt jeder Viruspräparation relativ zur M1-Menge, normiert auf den Wt. Die Quantifizierung der M1- und M2-Banden einer jeden Viruspräparation erfolgte parallel auf derselben Membran. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Virusinfektionen. Der t-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied im M2/M1-Verhältnis zwischen Wt und den Mutanten.

Wie in früheren Arbeiten^{216,219,222} erscheint M2 im reduzierenden SDS-Gel als eine Doppelbande, die in Präparationen des Wildtyps und jeder Mutante detektiert werden kann. Die in einigen M2-Varianten fehlende Acylierung führt zu elektrophoretisch mobileren Banden, möglicherweise durch eine veränderte Konformation. Diese ist in Transmembranproteinen, wie es das M2 ist, auch unter reduzierenden Bedingungen oft nicht gänzlich zerstört. Insgesamt verhindert keine der Mutationen die Rekrutierung von M2 zur Knospungszone. Um die M2-Mengen der Mutanten untereinander vergleichen zu können, wurden die Chemilumineszenz-Signalintensitäten der M2- und M1-Banden parallel, auf derselben Membran, bestimmt, miteinander ins Verhältnis gesetzt und auf den Wildtyp normiert (Abb. 27D). Die Mutanten HA Ac1 und HA Ac1 + M2 C50S,Y52S,Y57S besitzen tendenziell mehr M1 (oder weniger M2). Laut Students t-Test bestehen jedoch keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp.

Zuletzt wurde, um die in den Viruspartikeln enthaltene Menge viralen Genoms (RNP) zu quantifizieren, eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt. Hierfür wurden, um eine identische Menge an Viren zu analysieren, Virusproben auf einen HA-Titer von 2^6 eingestellt, von Aliquots die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese für die Echtzeit-PCR mit

M-Segment-spezifischen Primern (repräsentativ für das gesamte virale Genom) eingesetzt (vgl. Kap. 2.2.4.8). Proben drei verschiedener Viruspräparationen wurden analysiert. Die erhaltenen Ct (*cycle threshold*, Schwellenwert-Zyklus)-Werte der Proben sind in Abb. 28 dargestellt.

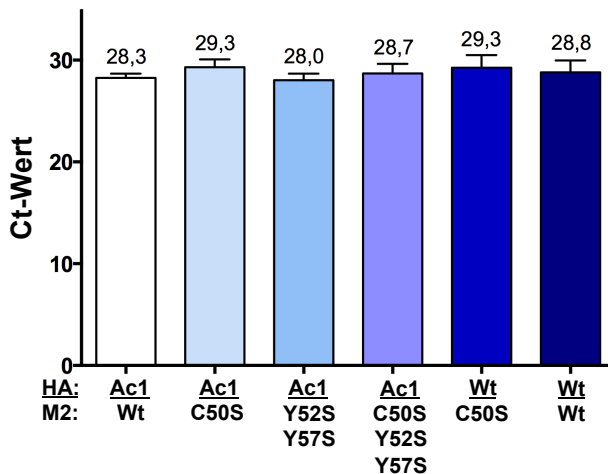


Abb. 28: Der RNP-Gehalt von Viruspartikeln mit Mutationen in HA und/oder M2 ist unverändert. MDCKII-Zellen wurden mit einer m.o.i. von eins infiziert. Nach 24 h wurde der Zellkulturüberstand geerntet und der HA-Titer bestimmt. RNA wurde von Virusproben mit einem HA-Titer von 2^6 isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR unter Verwendung M-Segment-spezifischer Primer quantifiziert. **A:** Der mittlere Ct-Wert \pm SD für Wt und jede Mutante, ermittelt aus Proben von drei unabhängigen Virusinfektionen, ist dargestellt. Ein t-Test ergab keine signifikanten Unterschiede des HA/RNP-Verhältnisses zwischen Wildtyp und den Mutanten.

Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt und ist umso kleiner, je mehr Ausgangsmaterial (cDNA bzw. genomische RNA des M-Segments) in der jeweiligen Probe vorliegt. Ein Anstieg des Ct-Wertes um eins entspricht einer halb so großen Menge an Ausgangs-cDNA. Die erhaltenen Ct-Werte sind für alle Mutanten vergleichbar mit dem Ct-Wert des Wildtyps und nicht signifikant verschieden (Abb. 28). Folglich ist das HA/RNP-Verhältnis (und somit auch die NP-Menge) in allen Mutanten vergleichbar mit dem Wildtyp.

3.3.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass die Substitution der zwei cytoplasmatischen palmitoylierten Cysteine von H1-Subtyp-HA die Herstellung infektiöser Viren unterbindet und diese somit essenziell sind. Infektiöse WSN-Viren mit fehlender Stearoylierung in der TMD (HA Ac1-Viren) können generiert werden und weisen eine leichte Wachstumsreduktion von einer Titerstufe gegenüber dem Wildtyp auf. Das zusätzliche Vorliegen eines nicht-acylierten M2-Proteins führt zu einer weiteren Wachstumsreduktion um eine Titerstufe, was auf einen synergistischen Effekt zwischen der Acylierung von HA und M2 hindeutet. Die Morphologie aller Mutanten ähnelt der von Wildtypviren, allerdings weisen HA Ac1 und noch mehr HA Ac1 + M2 C50S-Viren etwas mehr elongierte Partikel und auch perlenschnurartige Formen auf, was auf einen leichten Knospungsdefekt hinweisen könnte. Während der Genom-

gehalt aller Mutanten vergleichbar ist, ist ihr Proteingehalt sehr variabel. Das verhindert es, signifikante Unterschiede festzustellen.

3.4 Mutagenese der amphiphilen Helix (AH) von M2

3.4.1 Herstellung rekombinanter Influenzaviren mit Mutationen der M2-AH

Die in den vorhergehenden Experimenten charakterisierte S-Acylierung und die Cholesterol-Bindemotive des M2 sind in einer amphiphilen Helix im CP-Bereich des Proteins lokalisiert (vgl. Abb. 31A). Im letzten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung dieser Helix für den viralen Replikationszyklus untersucht werden. Aktuelle Publikationen deuten darauf hin, dass die AH eine entscheidende Rolle beim finalen Schritt der Virusknospung, dem Abschnüren von der Wirtszelle, spielt. Nicht die Sequenz oder definierte Aminosäuren, sondern vielmehr der amphiphile Charakter und die Gesamtstruktur der Helix per se sei dafür von Bedeutung (vgl. Kap. 1.4.2). Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Varianten des M2-Proteins mit umfassenden Modifikationen der AH generiert und charakterisiert. Neben einer M2-Variante mit deletierter Helixsequenz wurden zwei M2-Varianten mit gescrambelter Helixsequenz hergestellt (s. Abb. 31B). Dafür wurde einerseits die Sequenz vom Stamm WSN verwendet, von dem auch die restlichen Gene stammten, die zur Herstellung rekombinanter Viren dieser Studie genutzt wurden. Zusätzlich wurde die Wildtyphelix durch die gescrambelte Helixsequenz des Udorn-Stammes substituiert. Für ein Peptid der gleichen gescrambelten Udorn-Sequenz konnten Rossman *et al.*⁶⁹ zeigen, dass es im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr zur Tubulation von Membranen befähigt ist. Die Helixvorhersage mit dem Programm Jpred²³⁰ ergab, dass beide gescrambelten Varianten im Kontext der gesamten M2-Proteinsequenz noch eine Helix ausbilden.

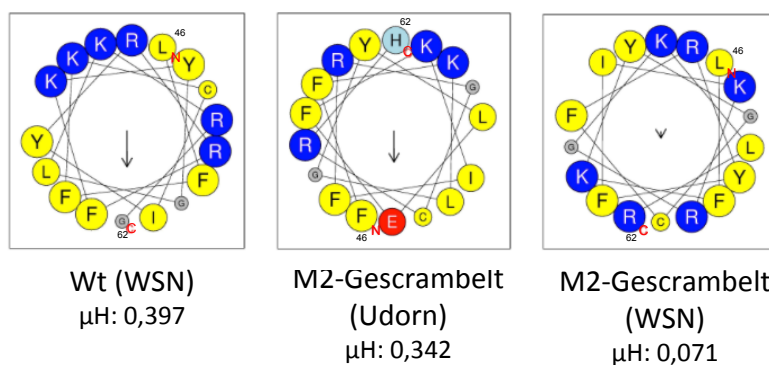


Abb. 29: Amphiphilität von Wt- und gescrambelten M2-Helices. Helixraddarstellung der genannten Helixvarianten von M2 (axialer Blick). Die Wirkrichtung (Pfeilspitze) und Stärke (Pfeillänge) sowie der Betrag des hydrophoben Moments (μH) sind angegeben. Die Ausrichtung der dargestellten Helixräder erfolgte entsprechend der Wirkrichtung des hydrophoben Moments. Erstellt mit Heliquest²²⁹.

Das hydrophobe Moment (μH), welches als Maß für die Amphiphilität einer Helix dient¹⁴³, wurde mittels des Programmes Heliquet²²⁹ bestimmt und war für die gescrambelte Udorn-Helix mit 0,342 vergleichbar dem hydrophoben Moment der Wt-Helix ($\mu H = 0,397$). Für die gescrambelte WSN-Helixvariante wurde absichtlich eine Sequenz ausgewählt, in der das hydrophobe Moment deutlich auf 0,071 reduziert war (s. Abb. 29). Mittels reverser Genetik nach Hoffman *et al.*²²⁶ wurde dann versucht infektiöse WSN-Viren herzustellen. Dafür wurde das mutationstragende M2-Plasmid zusammen mit sieben Plasmiden, die für die anderen viralen Proteine kodieren, in HEK-293T -Zellen transfiziert und drei Tage später der Überstand per Plaquetest auf MDCKII-Zellen hinsichtlich freigesetzter Viruspartikel überprüft. Interessanterweise war es möglich, rekombinante Viren für die gescrambelte Udorn-Variante, nicht aber für die gescrambelte WSN-Variante zu generieren, was nahelegt, dass das hydrophobe Moment der jeweiligen Helix eine Rolle spielt. Auch infektiöse Viren mit einer kompletten Deletion der Helixsequenz konnten in fünf Versuchen nicht generiert werden, obwohl parallel durchgeführte Kontrollexperimente mit dem Wt-M2-Plasmid bestätigten, dass die Transfektion prinzipiell erfolgreich war.

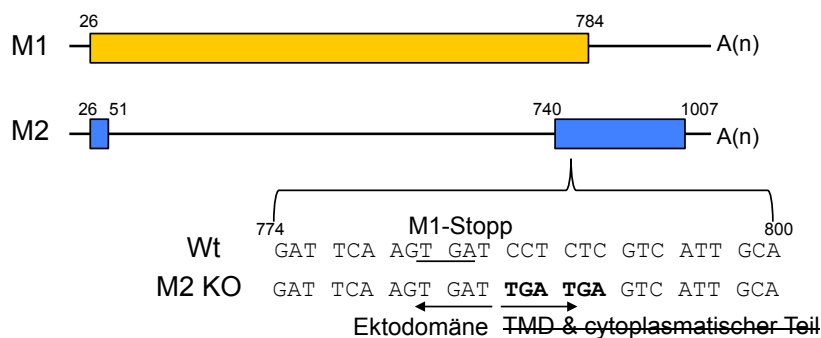


Abb. 30: M2-Deletionsmutante. Die M2-mRNA entsteht durch Spleißen aus demselben Genabschnitt, der auch für M1 kodiert. Die jeweils kodierenden Bereiche sind gelb (M1) und blau (M2) hervorgehoben und der relevante Sequenzabschnitt ist für WSN-Wt und die M2-Deletionsmutante (M2 KO) gezeigt. In der M2-Mutante wurden nach dem Stoppkodon des M1, zwei weitere Stoppkodons generiert (fett gedruckt), die im kodierenden Bereich des M2 liegen, so dass dessen Translation bereits hinter der Ektodomäne abbricht und kein funktionelles Protein gebildet, M1 jedoch normal translatiert wird.

Dies steht im Einklang damit, dass infektiöse Viren, denen das gesamte M2-Protein fehlt, in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht generiert werden konnten. Für die Herstellung solcher Viren wurde in Anlehnung an die Arbeit von Watanabe *et al.*²⁶⁶ ein Plasmid konstruiert in dem zwei Stoppkodons dazu führen, dass die M2-Translation frühzeitig abbricht und somit kein funktionelles M2-Protein synthetisiert werden kann (s. Abb. 30). Die Translation von M1, dessen Gen sich auf dem gleichen Gensegment wie das von M2 befindet, bleibt jedoch unbeeinflusst. In der Studie von Watanabe *et al.*²⁶⁶ wurde das M-Gen vom Stamm Udorn

verwendet und dort konnten infektiöse Viren generiert werden, die allerdings ein stark reduziertes Wachstum in der Zellkultur aufwiesen und im Mausmodell gar nicht replizierten.

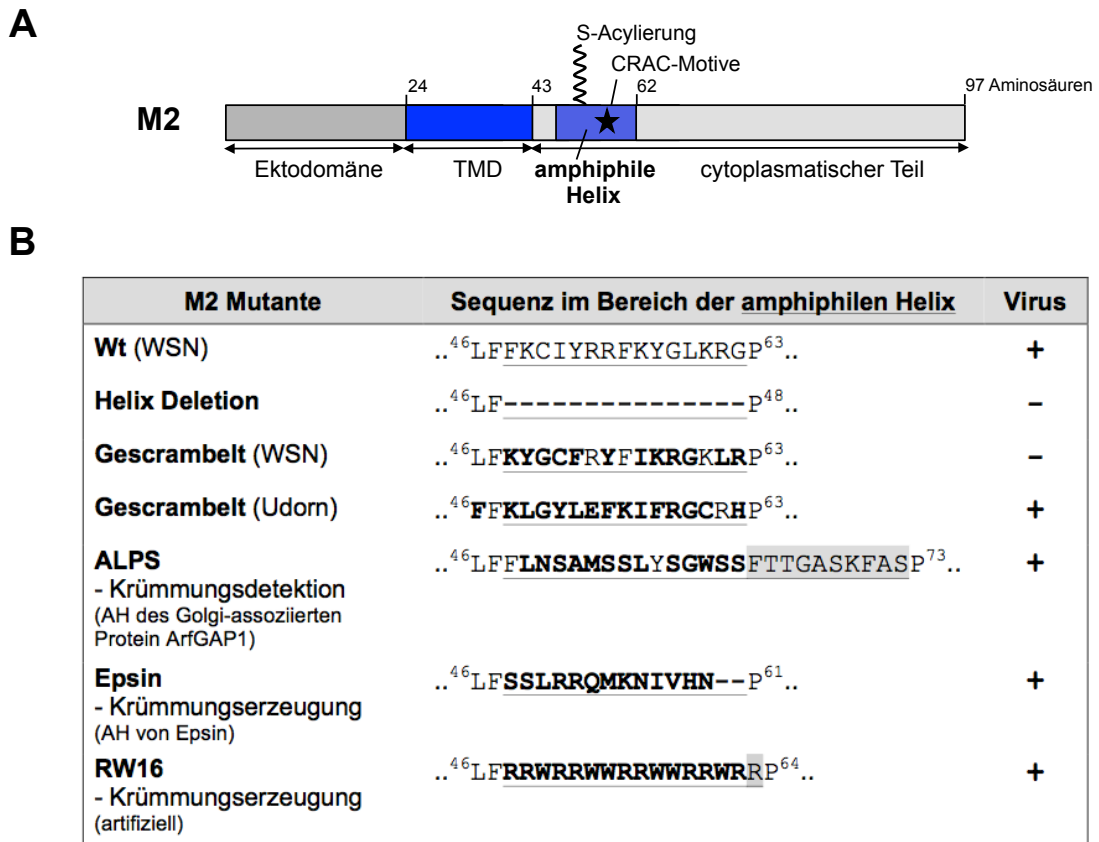


Abb. 31: Herstellung von Influenzaviren mit Modifikation der amphiphilen M2-Helix. **A:** Schematische Darstellung der Proteindomänen des M2 aus Influenza A (WSN). **B:** In M2 vorgenommene Mutationen. Die AH von M2 wurde deletiert, gescrambelt oder durch typische krümmungsdetektierende oder –induzierende Helices ersetzt. Der Bereich der M2-Sequenz (im Ein-Buchstaben-Aminosäurecode) ist durch hochgestellte Zahlen angegeben. Die Helixsequenz ist unterstrichen. Veränderungen in der Sequenz sind fett gedruckt, zusätzlich eingefügte As sind grau hinterlegt und Deletionen sind durch einen Strich (-) in der Sequenz gekennzeichnet. Es ist angegeben, ob für die jeweilige Mutante rekombinante Viren generiert werden konnten (+) oder nicht (-).

Einen Hinweis darauf, dass die amphiphile M2-Helix die Membrankrümmung detektieren kann, und so dazu dienen könnte das M2-Protein an der gekrümmten Knospungszone und/oder am Hals der knospenden Viren, wo das Protein für die finalen Abspaltung benötigt wird, zu positionieren, liefert die Arbeit von Wang *et al.*²⁶⁷. Dort wurde gezeigt, dass M2 stärker an Membranen hoher Krümmung bindet, wie es am Hals knospender Viren der Fall ist. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurde die Wildtyp M2-Helix durch die Helix des **ALPS**-Motivs des Golgi-assoziierten Proteins ArfGAP1 substituiert (s. Abb. 31B). Diese gilt als Paradebeispiel einer krümmungsdetektierenden Helix und bindet bevorzugt stark gekrümmte Membranen, wie sie in Partikeln einer Größe von 30-100 nm Größe vorliegen, die mit der von Influenzaviren vergleichbar ist. Die Krümmung wird unabhängig von der

Lipidzusammensetzung über Packungsdefekte in der Membran wahrgenommen (vgl. Kap. 1.2.5). Rekombinante Viren mit einer solchen M2-Variante konnten erfolgreich generiert werden. Des Weiteren deuten einige Studien darauf hin, dass die M2-Helix durch eine Insertion in die Membran am Hals der knospenden Viren eine Krümmung induziert, die zur Abspaltung der Viren von der Wirtszelle führt (vgl. Kap. 1.4.2). Daher wurde in einem weiteren Konstrukt die M2-Helix durch die AH von **Epsin** ersetzt (Abb. 31B). Diese ist ein typischer Krümmungsinitiator, kann in flache Membranen inserieren und sie tubulieren (s. Kap. 1.2.5). In einem letzten M2-Konstrukt wurde die Helixsequenz durch die Sequenz des artifiziellen, zellpenetrierenden Peptids **RW16** ersetzt. Dieses besteht ausschließlich aus Arginin und Tryptophan (Abb. 31B) und besitzt ein stark ausgeprägtes hydrophobes Moment von 0,991^{268,269}. Lamaziere *et al.*²⁷⁰ zeigten, dass RW16 GUVs zu tubulieren vermag. Ein ähnlicher Effekt wurde von Rossman *et al.*⁶⁹ für das Peptid der Wt-M2-Helix von Udorn beobachtet. Sowohl für die Epsin-, als auch die RW16-M2-Variante konnten infektiöse Viren generiert werden. Die AH kann also prinzipiell durch andere Helices ersetzt werden. Die exakte Sequenz der Helix ist somit nicht essenziell.

3.4.2 Die M2-Helix-Mutanten wachsen schlechter als Wildtypviren

Um die Viren mit M2-Helixmutationen hinsichtlich ihres Wachstums zu charakterisieren, wurden MDCKII-Zellen mit einer kleinen m.o.i. von 0,001 infiziert, so dass mehrere virale Replikationszyklen durchlaufen werden können. Der Virustiter im Zellkulturüberstand wurde zu definierten Zeitpunkten per Plaquetest ermittelt. Verglichen mit dem Wildtypvirus weisen alle M2-Mutanten eine reduzierte Replikationseffizienz auf (Abb. 32A). Auffällig ist, dass einige Viren bis 16 h (M2-Epsin und M2-ALPS) bzw. 24 h (M2-RW16) nach der Infektion vergleichbar wie Wildtypviren wachsen und erst danach eine Titerreduktion erfahren. Der maximale Titer für M2-RW16 von $3,7 \cdot 10^6$ wird 24 h.p.i. erreicht, danach sinkt der Titer im Überstand von mit M2-RW16-infizierten Zellen kontinuierlich, wohingegen der Wildtyp seinen maximalen Titer von $9,8 \cdot 10^8$ erst 48 h.p.i. erreicht. M2-ALPS-Viren wachsen bis 16 h nach der Infektion vergleichbar wie der Wildtyp, anschließend ist jedoch die Zunahme der Viren im Zellkulturüberstand deutlich reduziert. Der maximale Titer für M2-ALPS liegt bei $7,3 \cdot 10^5$ und wird 48 h.p.i. erreicht. Die M2-Epsin Variante wächst nur bis zu einem Titer von $3,5 \cdot 10^4$, der 16 h.p.i. erreicht wird und verzeichnet dann eine starke Reduktion des Titors: Nach 96 h sind reproduzierbar keine infektiösen Viren mehr im Überstand nachweisbar. Die Mutante mit gescrambelter Udorn-Helix zeigt eine gegenüber dem Wildtyp und allen anderen Mutanten reproduzierbare Verzögerung der Virenfreisetzung und erreicht den geringsten ma-

ximalen Titer von $3 \cdot 10^4$, welcher allerdings auch 96 h.p.i. noch vorliegt. Wildtyp und die Mutanten M2-RW16 und M2-ALPS weisen hingegen im Zeitraum 48 bis 96 h nach der Infektion eine Wachstumsreduktion von über zwei Titerstufen auf. Die Größe der gebildeten Plaques, dokumentiert 72 h.p.i., ist allerdings für alle Mutanten vergleichbar mit der des Wildtyps (Abb. 32C).

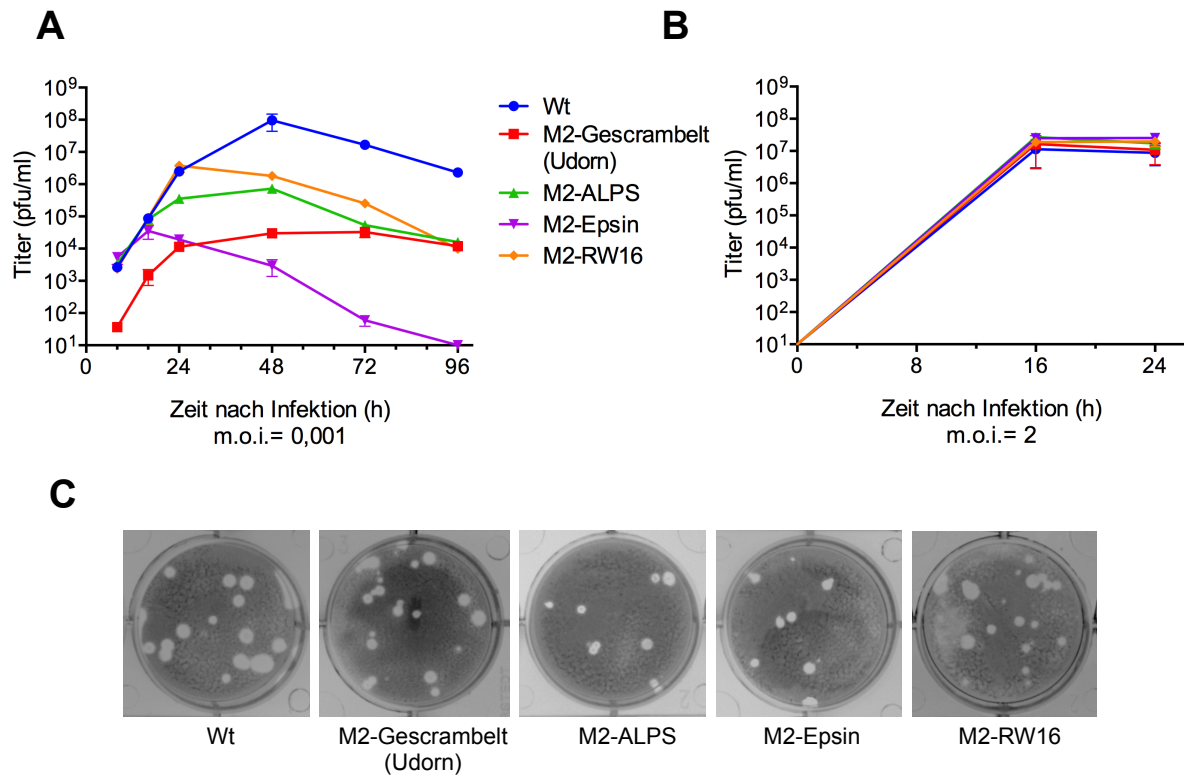


Abb. 32: Viren mit modifizierter amphiphiler M2-Helix wachsen schlechter. **A,B:** MDCKII-Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,001 (**A:** Mehrschritt-Wachstumskurve) oder mit einer m.o.i. von zwei (**B:** Einschnitt-Wachstumskurve) infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion die Titer mittels Plaquetest bestimmt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte von drei Experimenten \pm SEM. pfu = Plaque-bildende Einheiten. **C:** Repräsentative Plaques der Viren mit entsprechender Mutation. Dokumentiert 72 h.p.i.

Überraschenderweise ergab eine Einschnitt-Wachstumskurve, bei der eine hohe m.o.i. von zwei für die initiale Infektion eingesetzt wurde, was dazu führt, dass bereits zu Beginn alle Zellen infiziert werden und somit nur ein einziger Replikationszyklus durchlaufen wird, dass hier alle Mutanten wie das Wildtypvirus wachsen (Abb. 32B). Mögliche Ursachen, die den in der Mehrschritt-Wachstumskurve beobachteten Effekt erklären könnten, wurden als Nächstes initial untersucht und weitere Experimente stehen aus (s. a. Kap. 4.4.2).

3.4.3 Die M2-Varianten wirken nicht cytotoxisch

Es war denkbar, dass die modifizierten M2-Proteine, ausgestattet mit teilweise stark amphiphilen Helices (vgl. Tab. 15, Kap. 4.4.2), bei ihrer Expression in den Wirtszellen einen cytotoxischen Effekt auf diese ausüben, beispielsweise Membranen tubulieren und somit die effektive Produktion neuer Viren behindern. Um dies zu überprüfen, wurde ein Zellvitalitätstest, der MTT-Test nach Mosmann, durchgeführt (Kap. 2.2.3.6). Hierfür wurden MDCKII-Zellen in einer 96-Loch-Platte mit den verschiedenen Viren infiziert und zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion mit dem Farbstoff MTT versetzt. Dieser kann durch die Mitochondrien-Dehydrogenasen vitaler Zellen reduziert und so das blau-violette Formazan gebildet werden, welches sich kolorimetrisch quantifizieren lässt. Abb. 33 zeigt das Ergebnis des MTT-Tests.

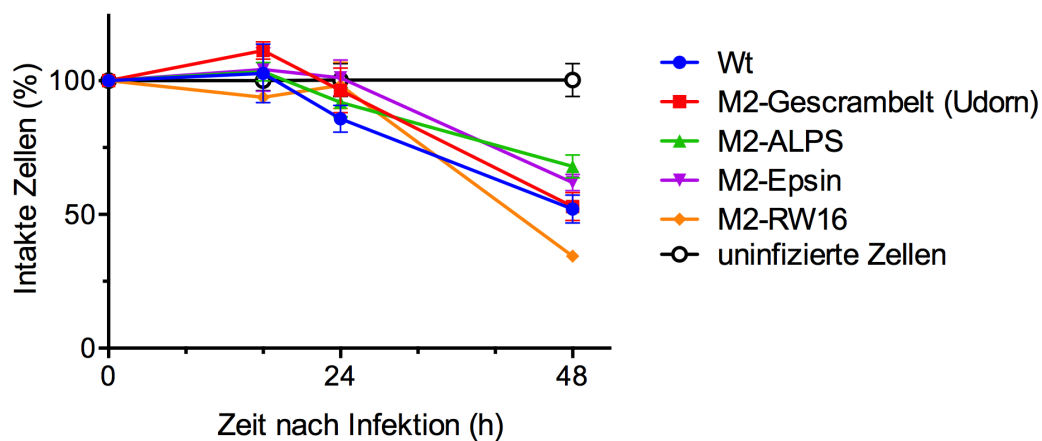


Abb. 33: Die M2-Proteine mit modifizierter Helix wirken nicht cytotoxisch. MDCKII-Zellen in 96-Loch-Platten wurden mit einer m.o.i. von 0,001 mit dem jeweiligen Virus infiziert und 16, 24 und 48 h.p.i. per MTT-Test der verbliebene Anteil intakter Zellen quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen die über den gleichen Zeitraum kultiviert und gleich behandelt wurden.

Die Zellen werden durch alle Viren annähernd gleichmäßig abgetötet. Lediglich für M2-RW16-Viren war 48 h.p.i. die Menge der vitalen Zellen mit 34 % gegenüber 50 % für den Wildtyp leicht reduziert, was auf einen geringen cytotoxischen Effekt hinweist. Ein solcher leichter cytotoxischer Effekt wurde auch von Lamaziere *et al.*²⁷⁰ für das RW16-Peptid beschrieben. Insgesamt konnte aber für keine der Mutanten ein signifikanter cytotoxischer Effekt auf die Wirtszellen, der die teilweise starke Titerreduktion der Mehrschritt-Wachstumskurve erklären würde, nachgewiesen werden.

3.4.4 Die Inkorporation von M2-Epsin und M2-RW16 in Viruspartikel ist reduziert

Weiterhin war vorstellbar, dass die Interaktion der M2-Varianten mit der Knospungszone oder auch mit M1, welches mit dem C-terminalen Bereich von M2 interagiert und es vermutlich so zur Knospungszone rekrutiert (vgl. Kap. 1.1.3), gestört ist. Das könnte sich in einer veränderten Inkorporation dieser beiden Proteine in Viruspartikeln niederschlagen und dies wurde daher wie folgt überprüft. Um den M1-Gehalt der verschiedenen Viren untereinander zu vergleichen wurden Zellkulturüberstände infizierter MDCKII-Zellen auf einen HA-Titer von 2^6 eingestellt und Aliquots einer reduzierenden SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit polyklonalem Antiserum gegen Geflügelpestvirus, welches mit WSN-M1 kreuzreagiert, unterworfen. Die Quantifizierung erfolgte über die Detektion der Chemilumineszenz-Signalintensitäten der M1-Banden von drei verschiedenen Virusinfektionen, die anschließend auf den Wildtyp normiert wurden (Abb. 34A).

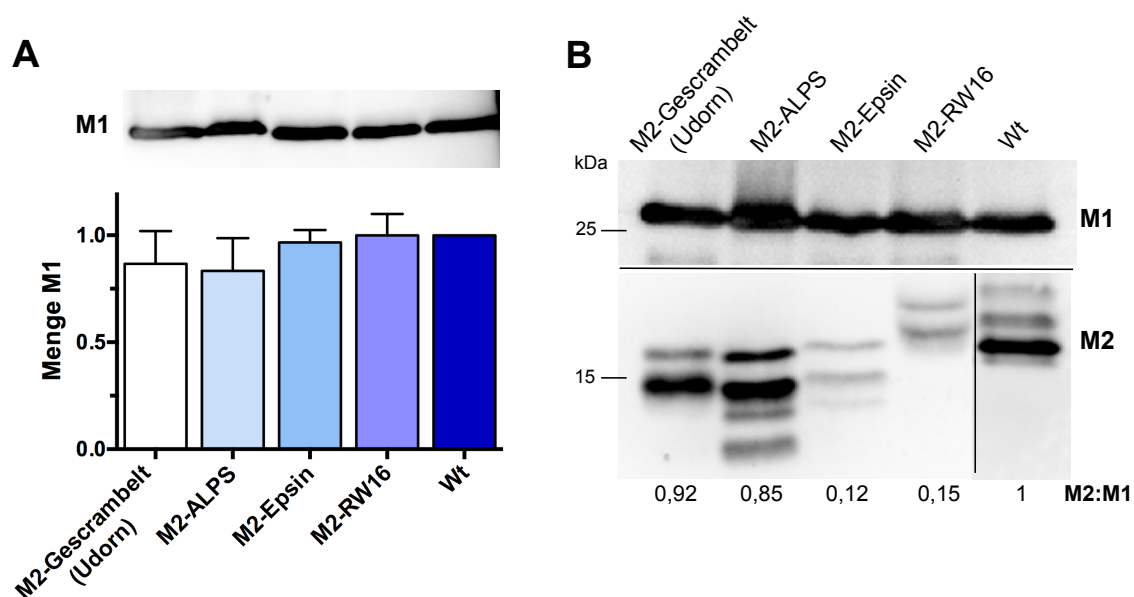


Abb. 34: Viren mit M2-Epsin und M2-RW16 enthalten weniger M2. MDCKII-Zellen wurden mit einer m.o.i. von eins infiziert. Nach 24 h wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, der HA-Titer bestimmt und gleiche Mengen einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot unterworfen. **A:** M1-Western Blot (KP-Antiserum) für Proben mit HA-Titer von 2^6 und Quantifizierung des M1-Gehalts über das Chemilumineszenzsignal aus drei unabhängigen Virusinfektionen. Dargestellt sind die auf den Wildtyp normierten Mittelwerte \pm SD. Students t-Test (ungepaart, zweiseitig) zeigte keine signifikanten Unterschiede im HA/M1 Verhältnis zwischen Wt und Mutanten. **B:** M1- und M2-Western Blot (Anti-M2-14C2) für Proben mit auf 2^7 eingestelltem HA-Titer. Durchgezogene Linien trennen verschiedene Blots. Angegeben ist die M2-Menge relativ zu M1, normiert auf den Wildtyp. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Virusinfektionen.

Der M1-Gehalt, relativ zur HA-Menge, entspricht für alle untersuchten Viren dem in Wildtypviren. Zur Detektion von M2 wurden die Zellkulturüberstände infizierter MDCKII-Zellen auf einen HA-Titer von 2^7 eingestellt und ein Western Blot mit M1- und M2-spezifischem

Antikörper durchgeführt (Abb. 34B). Während alle Viren in etwa gleich viel M1 enthalten, korreliert die M2-Menge nur für die gescrambelte M2-Variante und M2-ALPS mit der des Wildtyps. Die Menge von M2-Epsin und M2-RW16 ist hingegen deutlich reduziert. Zudem weisen die modifizierten M2-Varianten ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel auf. Dies könnte das Ergebnis einer verschiedenartigen Konformation, bedingt durch ungleiche Sequenzlängen, Ladungen und die fehlende Acylierung sein. Für M2-ALPS sind neben den zwei prominenten Banden weitere, elektrophoretisch mobilere Banden im Blot sichtbar, bei denen es sich möglicherweise um Abbauprodukte des M2-Proteins handelt. Das Experiment wurde bisher zweimal durchgeführt und liefert Hinweise, dass die in Viruspartikeln inkorporierten Mengen von M2-Epsin und M2-RW16 stark reduziert sind.

3.4.5 Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass M2 und seine amphiphile Helix wichtig für die Herstellung infektiöser WSN-Viren sind. Viren ohne M2 bzw. mit einer Helixdeletion konnten nicht generiert werden. Infektiöse Viren, in denen die Helix durch andere Helices ersetzt wurde, können prinzipiell hergestellt werden. Die Amphiphilität der Helix scheint wichtig zu sein. So konnte für die gescrambelte WSN-M2-Variante, welche ein sehr geringes hydrophobes Moment besitzt, keine infektiösen Viren generiert werden und die M2-RW16-Variante mit dem größten hydrophoben Moment wuchs von allen Mutanten am besten. Die exakte Helixsequenz scheint eine untergeordnetere Rolle zu spielen, könnte aber für die Inkorporation von M2 in Viruspartikel (und somit die Interaktion mit der Knospungszone) von Bedeutung sein. Weitere Experimente sind notwendig um die Ursache des schlechteren Wachstums der M2-Mutanten abschließend zu klären. Möglicherweise ist die Stabilität der Viren beeinträchtigt (s. Kap. 4.4.2).

4 DISKUSSION

Die Rolle der HA-Raft-Lokalisationssignale für das Clustern mit M2 sowie die Bedeutung der HA-Acylierungen für die Herstellung infektiöser Viren und deren Wachstum werden im ersten Teil diskutiert. Die Bedeutung der Acylierung und Cholesterol-Bindemotive von M2 für seinen apikalen Transport und für die Assoziation mit den durch HA stabilisierten Raft-Domänen der Zellplasmamembran waren ein weiterer zentraler Bestandteil dieser Arbeit und werden im zweiten Abschnitt diskutiert. Im dritten Teil wird der Frage nach einem synergistischen Effekt zwischen den Acylierungen von M2 und HA nachgegangen. Des Weiteren wurde die Rolle der amphiphilen M2-Helix bei der Virusknospung untersucht, die im vierten Abschnitt diskutiert wird. Zuletzt werden die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zusammengefasst und ein Ausblick gegeben.

4.1 HAs Acylierungen

4.1.1 HAs Acylierungen sind von Bedeutung für das Clustern mit M2

Das M2 mit Wt-HA, nicht aber mit HA mit zerstörten Raft-Lokalisationssignalen clustert, wurde in einer früheren Arbeit gezeigt²¹⁷. Um festzustellen, welcher Einfluss den beiden Raft-Lokalisationssignalen des HA (Acylierungen sowie hydrophobe As zu Beginn der TMD, vgl. Abb. 14A) jeweils für das Clustern mit M2 zukommt, wurden in der vorliegenden Arbeit FLIM-FRET-Messungen durchgeführt. FRET ist der strahlungslose Energietransfer von einem angeregten Donor- auf ein geeignetes Akzeptor-Fluorophor und findet statt, wenn sich die Fluorophore in starker räumlicher Nähe befinden (vgl. Kap. 2.2.2.7). FLIM-FRET-Messungen sind somit hervorragend dafür geeignet die Interaktion zwischen zwei Proteinen (in diesem Fall HA und M2), die mit einem geeigneten Fluorophor markiert sind, nachzuweisen. Diese kann entweder direkt sein oder darauf beruhen, dass beide Proteine in der gleichen Domäne lokalisiert sind^{58,94}. Letzteres wird für HA und M2 angenommen (vgl. Kap. 1.4.2 und Abb. 9). Die Messungen vorheriger Arbeiten (zusammengefasst in Tab. 13) ergaben, dass M2 im Gegensatz zu HA nicht mit dem Raft-Marker interagieren kann. Es clustert aber mit HA, wenn dessen Raft-Assoziationsmotive intakt sind, was für eine indirekte HA-M2-Assoziation spricht. Diese ist vermutlich dadurch bedingt, dass M2 mit den durch HA stabilisierten, größeren Raft-Domänen interagiert und beide Proteine somit in derselben Plasmamembrandomäne vorliegen. Vorherige Arbeiten zeigten auch, dass die Assoziation von HA mit dem Raft-Marker (und somit die Bildung stabiler Raft-Domänen) stark von den Raft-Lokalisationssignalen des HA und von einem intakten Aktin-Cytoskelett abhängt (vgl.

Abb. 9A und Tab. 13). Die Bedeutung der einzelnen Raft-Lokalisationssignale von HA und M2 für deren Interaktion wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

FRET-Donor (...-Cer)	FRET-Akzeptor (...-YFP)	Clustern	Referenz
HA-wt	Myr-Pal-Peptid	+++	Engel <i>et al.</i> ¹⁸⁴
HA-wt	Myr-Pal-Peptid + CytoD	–	Veit <i>et al.</i> ⁹⁴
HA-C3S	Myr-Pal-Peptid	+	Engel <i>et al.</i> ¹⁸⁴
HA-VIL3A	Myr-Pal-Peptid	++	Engel <i>et al.</i> ¹⁸⁴
HA-C3S+VIL3A	Myr-Pal-Peptid	+	Engel <i>et al.</i> ¹⁸⁴
M2-wt	Myr-Pal-Peptid	–	Thaa <i>et al.</i> ²¹⁷
HA-wt	M2-wt	+++	Thaa <i>et al.</i> ²¹⁷
HA-wt	M2-wt + CytoD	–	Thaa <i>et al.</i> ²¹⁷
HA-C3S	M2-wt	(+)	diese Arbeit
HA-VIL3A	M2-wt	++	diese Arbeit
HA-C3S+VIL3A	M2-wt	+	Thaa <i>et al.</i> ²¹⁷
HA-wt	M2-C50S	+++	diese Arbeit
HA-wt	M2-Y52S,Y57S	+++	Thaa ¹⁰¹
HA-wt	M2-C50S + Y52S,Y57S	+++	diese Arbeit
HA-Ac1	M2-wt	+	diese Arbeit
HA-Ac1	M2-C50S	(+)	diese Arbeit

Tab. 13: Zusammenfassung der Clusteranalysen von FLIM-FRET-Messungen. Wobei +++ starkes Clustern, (+) stark reduziertes Clustern und – gar kein Clustern bedeutet. Mutationstragende HA- bzw. M2-Proteine sind grau hinterlegt. Myr-Pal-Peptid = Raft-Marker²⁷¹, CytoD = Cytochalasin D, ein das Cytoskelett zerstörendes Agens²⁷².

Für die FLIM-FRET-Messung wurden CHO-Zellen mit Konstrukten, kodierend für HA-Cer als FRET-Donor und M2-YFP als FRET-Akzeptor, kotransfiziert. Beide fluoreszenzmarkierten Proteine wurden koexprimiert und waren, wie in vorherigen Studien^{184,217}, an der Plasmamembran lokalisiert (vgl. Abb. 14B). Die Interaktion zwischen Wt-HA und Wt-M2 konnte per FLIM-FRET verifiziert werden. Die Clusteranalyse ergab einen, gemessen an der Akzeptorintensität, sehr kleinen relativen K_D -Wert (Abb. 14C), was in Übereinstimmung mit den von Thaa *et al.*²¹⁷ für die gleichen Konstrukte erhaltenen Ergebnissen auf ein Clustern der beiden Proteine hindeutet. Die durchschnittliche FRET-Effizienz war mit 10,5 % geringer als die von Thaa *et al.*²¹⁷ erhaltene ($E = 16,3\%$). Dies kann durch unbeeinflussbare Faktoren am jeweiligen Messtag verursacht sein, oder wie bereits Zacharias *et al.*²⁷³ begründeten, daran liegen, dass FRET, gerade im zweidimensionalen Raum der Plasmamembran und besonders bei hohen Proteinkonzentrationen, auch durch zufällige Interaktion erfolgt und die FRET-Effizienz somit über die Spezifität der Interaktion Membran-assoziiierter Proteine mitunter keine verlässliche Aussage liefert. Da die FRET-Effizienzen der analysierten Proteinpaare in der vorliegenden Studie generell nur geringe Unterschiede zu denen von Wt-Proteinen aufwiesen und somit keine eindeutige Einschätzung erlaubten, wurde für jedes Proteinpaar stets

die Clusteranalyse durchgeführt. Diese berücksichtigt die Konzentration der FRET-Akzeptormoleküle in der Membran jeder einzelnen gemessenen Zelle. Deshalb wurde dem daraus bestimmten K_D -Wert mehr Gewicht beigemessen.

Um die Bedeutung der beiden Raft-Lokalisationssignale des HA für das Clustern mit M2 zu untersuchen, wurden Messungen für **HA-Cer-VIL3A** bzw. **HA-Cer-C3S** (alle drei Acylierungen fehlen) jeweils mit M2-YFP-wt durchgeführt. Die Clusteranalyse ergab quasi lineare Kurven und K_D -Werte, die deutlich höher als in Experimenten mit HA-Cer-wt waren, was auf ein reduziertes Clustern hindeutet (vgl. Abb. 16A-C und Tab. 13). Das liegt, wie bereits erklärt, vermutlich daran, dass die Raft-Lokalisationssignale des HA für die Organisation stabiler Raft-Domänen benötigt werden, mit denen M2 dann interagieren kann¹⁸⁴ (s. a. Abb. 35A). Werden diese stabilen Raft-Domänen nicht gebildet, liegen M2 und HA nicht innerhalb derselben Plasmamembrandomäne vor und folglich ist kein bzw. nur ein reduziertes Clustern nachweisbar (Abb. 35C).

Wie bereits bei Messungen zwischen HA-Raftmotivmutanten mit dem Raft-Marker¹⁸⁴, führt auch bei Messungen mit M2 das Fehlen der HA-Acylierungen zu einem stärkeren Anstieg des K_D -Wertes, als die Zerstörung des VIL-Motivs (vgl. Abb. 19). Die Acylierungen könnten folglich für die Organisation der Knospungszone von größerer Bedeutung sein. Die FLIM-FRET-Messungen ergaben weiterhin, dass bereits das Fehlen von **Ac1** (der Acylierung innerhalb der TMD, vgl. Abb. 35A) im HA das Clustern mit M2-Wt stark reduziert (Abb. 18A). Die Wichtigkeit dieser Acylierung könnte durch FLIM-FRET-Messungen zwischen HA Ac1 und dem Raft-Marker weiter untersucht werden. Für eine größere Bedeutung der Acylierungen gegenüber dem VIL-Motiv spricht auch, dass rekombinante Viren mit Mutation im VIL-Motiv hergestellt werden können. Die Titer solcher Viren sind um etwa 2-4 log-Stufen gegenüber dem Wildtyp reduziert⁵⁹. Hingegen konnten Viren mit vollständig nicht-acyliertem HA in der vorliegenden Arbeit sowie in anderen Studien nicht hergestellt werden und Viren, in denen individuelle Acylierungspositionen mutiert sind, weisen starke Wachstumsdefekte auf (s. a. Kap. 4.1.2).

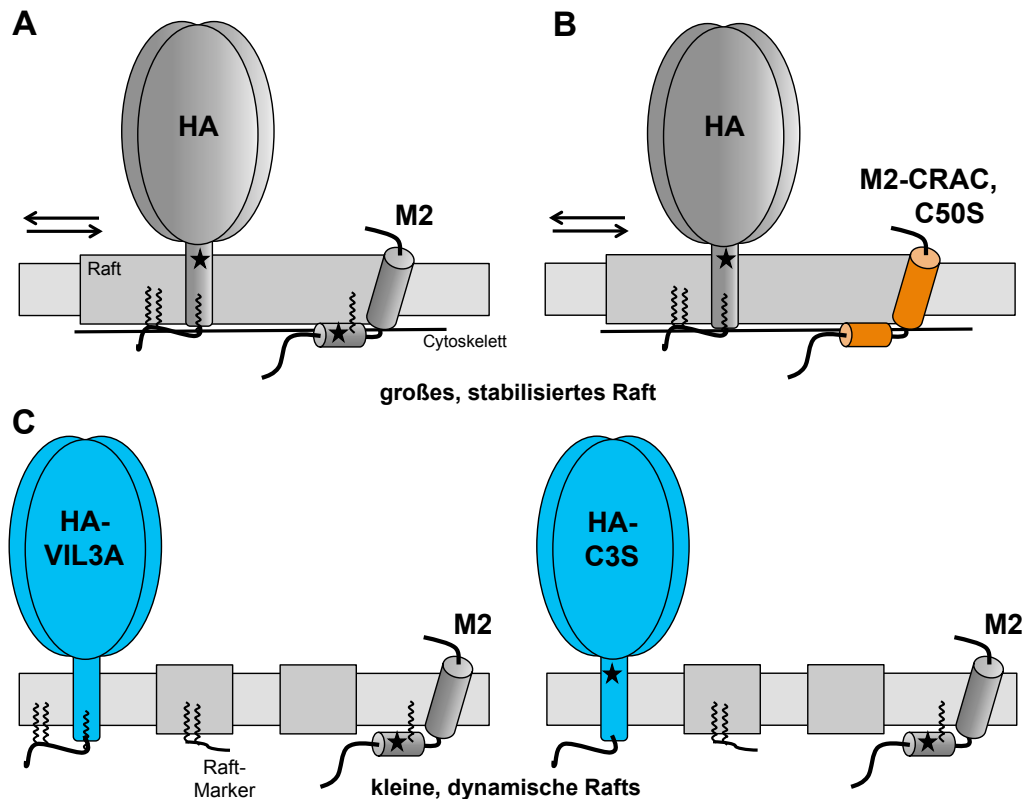


Abb. 35: Raft-Assoziation von HA und M2 mit Mutationen in typischen Raft-Assoziationsmotiven. **A:** HA ist in Membran-Rafts lokalisiert und bildet die größeren, stabileren Raft-Domänen aus, mit denen M2, welches am Rand der Knospungszone lokalisiert ist, interagiert. Verantwortlich für die Raft-Assoziation des HA sind das VIL-Motiv (Stern) und die S-Acylierungen (gewellte Linien). Die potenziellen Raft-Motive des M2 sind seine CRAC-Motive (Stern) und eine S-Acylierung (gewellte Linie). Kortikales Aktin (schwarze Linie) wird für das Clustern von HA mit Rafts und mit M2 benötigt. Die Pfeile zeigen an, dass die Proteinassoziation mit den Raft-Domänen dynamisch ist. **B:** M2 interagiert trotz zerstörter CRAC-Motive und fehlender S-Acylierung mit den stabilisierten Raft-Domänen. **C:** Das Fehlen bereits eines der beiden Raft-Assoziationssignale im HA führt zu dessen zufälliger Verteilung an der Plasmamembran. Es werden keine stabilen Raft-Domänen gebildet. HA clustert dann weder mit dem Marker für kleine, unstimulierte Rafts noch mit M2. Mutationstragendes HA bzw. M2 ist farbig dargestellt.

4.1.2 HAs Acylierungen sind wichtig für Herstellung und Wachstum rekombinanter Viren

Nachdem gezeigt wurde, dass HAs Acylierungen für das Clustern mit M2 von großer Wichtigkeit sind, wurde ihre Bedeutung im viralen Kontext untersucht. Infektiöse WSN-Viren mit unteracyliertem HA konnten mittels reverser Genetik basierend auf dem System von Hoffman *et al.*²²⁶ lediglich für Viren hergestellt werden, deren HA an Position 554 (Ac1), innerhalb der TMD, nicht acyliert war (vgl. Abb. 20A links). Das Wachstum solcher Viren war verglichen mit dem Wiltyp nur um etwa eine Titerstufe reduziert und die gebildeten Plaques waren etwas kleiner (vgl. Abb. 21 A und C). Bei Substitution der cytoplasmatischen Cysteine durch Serin, sowie für alle möglichen Kombinationen von Doppelacylierungsmutanten, konnten hingegen keine infektiösen Viren hergestellt werden (vgl. Abb. 20A und B). Dies deutet auf eine essen-

zielle Funktion der beiden cytoplasmatischen Palmitoylierungsstellen hin, wohingegen das stearoylierte Cystein am Ende der TMD von H1-Subtyp-HA nicht essenziell ist.

HA ist ein hoch variables Protein mit sehr geringer Aminosäurekonservierung. Ein Sequenzvergleich, dargestellt in Abb. 36, zeigt, dass alle HA-Subtypen mindestens drei, manche sogar vier Cysteine in der Acylierungsregion aufweisen. Die Position der ersten beiden acylierten Cysteine (Ac1 und Ac2) ist in verschiedenen Subtypen manchmal um eine oder wenige Aminosäuren verschoben, aber innerhalb der Subtypen selbst streng konserviert. Die Subtypen H8 und H9 besitzen sogar kein Cystein am Ende der TMD, dafür liegt im CP-Bereich ein drittes, palmitoyliertes Cystein an Position 559 vor (vgl. Abb. 36B). Das zweite acylierte Cystein ist konservierter als Ac1. Es befindet sich bei den meisten Subtypen an Position 561. Nur die Subtypen H13 und H16 weisen nicht dort, sondern an Position 559 ein Cystein auf. Das distale, dritte Cystein ist hingegen in allen Subtypen streng konserviert (Abb. 36B).

Die Resultate reverser Genetikstudien zu Influenzavirus-Acylierungsmutanten aus dieser und vorherigen Arbeiten fasst Abb. 37 zusammen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen eine Studie von Zurcher *et al.*²⁶³, in der ein weniger effizientes reverses Genetiksystem genutzt wurde. Die Herstellung infektiöser WSN-Viren war auch dort nicht möglich, wenn die cytoplasmatischen Cysteine (Cys560 und Cys563) durch Serin ersetzt wurden. Allerdings konnten in jener Arbeit Viren hergestellt werden, wenn das Cys560 durch hydrophobe Aminosäuren wie Alanin und besonders die voluminösen Aminosäuren Tyrosin oder Phenylalanin ersetzt wurde (vgl. Abb. 37B). Die Seitengruppen dieser Aminosäuren können aufgrund ihrer Hydrophobizität mit Membranen interagieren, in diese inserieren und so die Acylierung am Cystein des Wildtyps vermutlich zumindest teilweise funktionell ersetzen. Das Wachstum solcher Viren war nur um ein bis zwei Titerstufen gegenüber Wildtypviren reduziert. Passend dazu zeigt auch der Vergleich der HA-Sequenzen aus der Influenzadatenbank, dass HA-Subtypen ohne Acylierung an einer der Acylierungspositionen dort stattdessen eine hydrophobe Aminosäure (Methionin, Valin, Leucin, Isoleucin oder Phenylalanin) besitzen (s. Abb. 36).

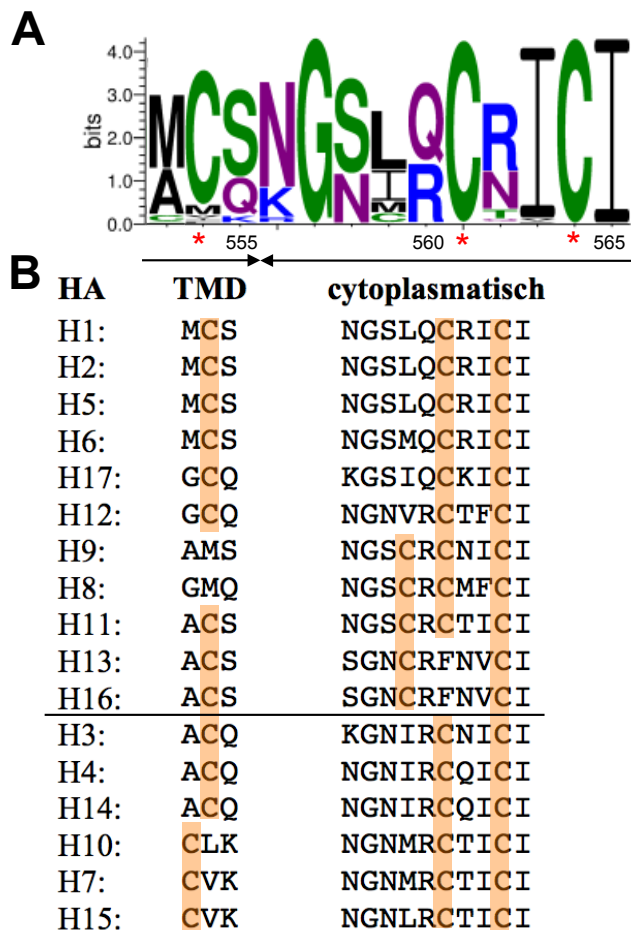


Abb. 36: Die acylierten Cysteine im HA C-Terminus sind stark konserviert. **A:** Alignment des C-Terminus aller einzigartigen HA-Subtyp-Sequenzen aus der Influenzadatenbank (<http://www.fludb.org/>), Stand April 2014, dargestellt mittels WebLogo²³⁴. Grafik erhalten von L. Kordyukova. Die obersten Buchstaben an jeder Position des Logos entsprechen der Konsensus-Aminosäuresequenz. Die Gesamthöhe der Stapel zeigt die Konservierung, die Höhe der Symbole innerhalb des Stapels das relative Vorkommen jeder Aa an der jeweiligen Position an. Gruppen von Aa mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften sind in verschiedenen Farben angegeben: negativ geladene Aa (rot), positiv geladene Aa (blau), große und hydrophile Aa (lila), neutrale Aa (grün), hydrophobe Aa (schwarz). Die Aa-Nummerierung entspricht der von HA des Stammes A/WSN/33 (H1N1). Die relativen Grenzen der TMD und des CP-Bereiches sind markiert. Die drei konservierten Cysteine sind mit roten Sternchen gekennzeichnet. **B:** Konsensussequenz des C-Terminus der verschiedenen HA-Subtypen. Die Acylierungsstellen sind farbig hervorgehoben. Gruppe 1-HAs befinden sich über dem horizontalen Strich, Gruppe 2-HAs darunter. Sequenzanalyse aus Brett *et al.*¹⁰⁹, modifiziert.

Ebenfalls im Einklang mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie sind die Resultate reverser Genetikstudien mit zwei anderen Influenzavirusstämmen. Rekombinante Viren in denen zwei (FPV, *fowl-plague virus*, H7-Subtyp¹⁸⁶) oder drei (Udorn-Virus, H3-Subtyp¹⁸⁷) Acylierungsstellen des HA durch Serin ersetzt wurden konnten nicht hergestellt werden (Abb. 37B). Viren mit einfach- oder doppelt-nicht-acyliertem HA waren stark attenuiert, wenn die stark konservierte Acylierung an Ac2 oder Ac3 fehlte, wuchsen hingegen vergleichsweise gut, wenn die geringer konservierte Stearoylierung in der TMD (Ac1) fehlte (vgl. Abb. 37B). In einer anderen Studie konnte außerdem für H1-Subtyp-HA gezeigt werden, dass Cys554 (Ac1) in den CP-Bereich des HA verschoben werden kann (Ac1 + L559C-Viren), es dort weiterhin acyliert wird¹⁰⁹ und das Viruswachstum nicht beeinträchtigt ist²⁷⁴ (Abb. 37). Dies deutet darauf hin, dass Leu559 natürlicherweise mit der Membran interagiert.

Insgesamt liegt die Vermutung nahe, dass das hydrophobe, stark konservierte Motiv ICI (563-565) am C-terminalen Ende des HA (s. Abb. 36) zusammen mit Ac2 (Cys561) und Ac1 (Cys554) der Verankerung an der inneren Plasmamembran dienen. Das C-terminale Isoleucin ist komplett konserviert. Ile563 ist in einigen Subtypen durch Phenylalanin oder Valin ersetzt (Abb. 36). Die Substitution des Ile563 durch das hydrophile Glutamin erlaubt keine

Herstellung infektiöser Viren, die Substitution durch das lange, hydrophobe Leucin hat hingegen nur geringe Effekte auf das Viruswachstum²⁷⁴. Dass Ac1 innerhalb der hydrophoben TMD liegt (vgl. Abb.37A), könnte der Grund dafür sein, dass diese Acylierung am ehesten erlässlich ist. Dazu passt auch die Tatsache, dass **Influenza-B-Viren** ein HA besitzen, welches zwei (in allen 3700 Stämmen der Datenbank¹⁰⁷) konservierte, cytoplasmatische Palmitoylierungen, jedoch keine Acylierung innerhalb der TMD aufweist (vgl. Abb. 37A). Die Rolle der HA-Palmitoylierung wurde in Influenza-B-Viren zwar nicht per reverser Genetik analysiert, aber mit einem HA-Expressionssystem war nach Zerstörung von einer (aber überraschenderweise nicht nach Zerstörung beider) Acylierungspositionen die Bildung der Fusionspore (und somit vermutlich der virale Eintritt) um 90 % reduziert. Dies weist darauf hin, dass die Acylierung auch hier für die effektive Virusreplikation benötigt wird.¹⁹⁰ In einer anderen Arbeit wurde zudem gezeigt, dass die Deletion des kompletten HA-CP-Bereiches in Influenza-B-Viren (wie auch in Influenza-A-Viren²⁷⁴) zu Viren mit starken Wachstumsdefekten führt²⁷⁵ (vgl. Abb. 37B). Neben den fehlenden Acylierungen könnte dort außerdem eine fehlende M1-Interaktionsstelle im CP-HA-Bereich die Ursache sein^{187,262,275}. Das Protein HEF (Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein) von **Influenza-C-Viren** besitzt indessen einen sehr kurzen C-Terminus von vier Aminosäuren und nur eine einzige Acylierung (in der TMD, s. Abb. 37A). Viren in denen diese Acylierung fehlt wachsen in der Zellkultur nur etwa eine Titerstufe schlechter als der Wt²⁷⁶. Dies deutet erneut und im Einklang mit den Ergebnissen aller anderen Studien darauf hin, dass die cytoplasmatischen, palmitoylierten Cysteine wichtiger sind als die stearoylierten am Ende der TMD.

Prinzipiell können Viren mit unteracyliertem HA Defekte zu Beginn der Infektion, bei der Fusion mit der Wirtszellmembran, oder bei der Assemblierung und Knospung aufweisen (vgl. Kap. 1.2.3 und 1.3.2). Wie bereits in Kap. 4.1.1 diskutiert, deuten die FLIM-FRET-Messungen dieser Arbeit darauf hin, dass HA-C3S und HA-Ac1 eine reduzierte Raft-Assoziation besitzen. Dies könnte die Assemblierung stören und sich in einer veränderten Viruszusammensetzung manifestieren. Daher wurde die Zusammensetzung von HA Ac1- (und den anderen in dieser Arbeit hergestellten) Viren mittels metabolischer Markierung, Western Blot und qPCR untersucht. Da Knospungsdefekte sich zudem oft in einer veränderten Virusmorphologie niederschlagen wurden auch elektronenmikroskopische Betrachtungen vorgenommen.

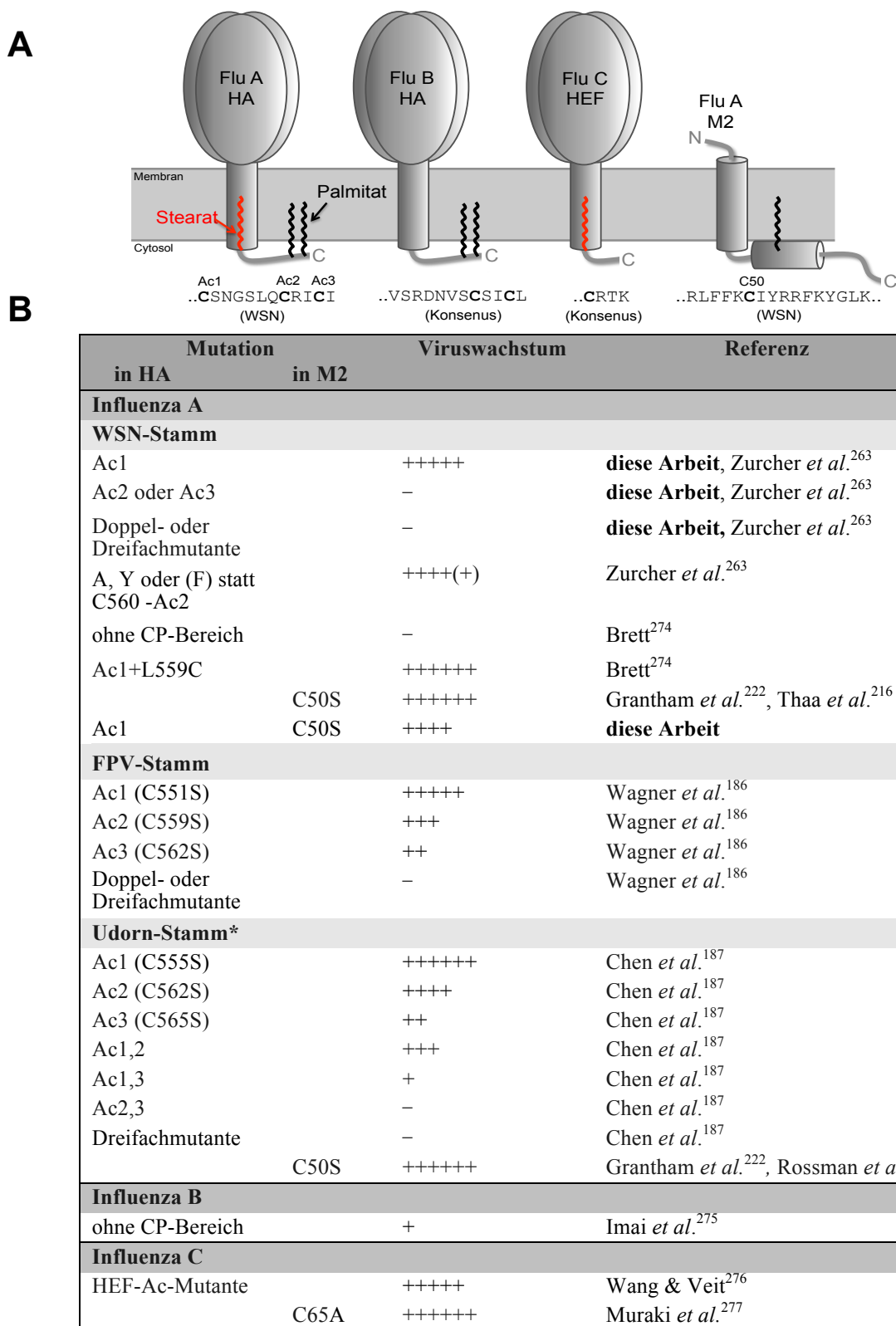


Abb. 37: Übersicht der Ergebnisse reverser Genetikstudien zu Influenzavirus-Acylierungsmutanten. **A:** Skizze von HA bzw. HEF (Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein) von Influenza- (Flu) A-, B- bzw. C-Viren und von FluA-M2. Die Fettsäuren im CP-Proteinbereich sind als gewellte Linien dargestellt. Die C-terminale Sequenz der individuellen Proteine ist angegeben, entweder für den Stamm WSN oder als Konsensussequenz aus der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). S-acylierte Cysteine sind fett gedruckt. Modifiziert nach Veit & Siche¹⁰⁷ **B:** Zusammenfassung der Ergebnisse zu Acylierungsmutanten von HA und M2. – = kein Viruswachstum in Zellkultur, +++++ = Viruswachstum wie Wt, ein Pluszeichen weniger bedeutet eine Wachstumsverschlechterung um etwa eine Titerstufe. *Angaben für HA-Mutanten beziehen sich hier auf die Fähigkeit, Plaques auf MDCKII-Zellen zu bilden und deren Größe im Vgl. zu Wt-Plaques (+++++ = Plaquegröße wie Wt, – = keine Plaques erhalten).

Die **metabolische Markierung** ergab, dass wie in anderen Studien auch, M1 das am stärksten vertretene Protein in Wildtyp-Viruspartikeln ist (Ref. 264 und Quellen darin, vgl. Abb. 25). Auch die relativen Mengen von NP und HA (jeweils zu M1) liegen mit 0,7 bzw. 0,65 im gleichen Bereich, wie per SDS-PAGE und Coomassiefärbung für den gleichen Virusstamm geschätzt wurde²⁶⁵ (Abb. 25). Allerdings liegen die hier ermittelten Mengen höher, als die kürzlich durch sensitive Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie bestimmten, bei der die relativen Mengen für NP = 0,31 und für HA = 0,17 betrugen²⁶⁴. Diese relativ großen Unterschiede, besonders für HA, könnten einer weniger effizienten Detektion von Glyko- und Transmembranproteinen durch Massenspektrometrie-basierte Methoden geschuldet sein, da die hydrophoben Peptide des Membranankers und des Fusionspeptids von HA in der Massenspektrometrie-Analyse eine schwer lösbare Herausforderung darstellen. Alternativ könnten auch Unterschiede in der Probenpräparation und die Wirtszellen (MDCKII- vs. MDBK-Zellen) die Proteinmengen beeinflussen.

Auffällig ist, dass zwischen verschiedenen Wildtyp-Viruspräparationen mitunter eine beachtliche Variabilität der Proteinanteile besteht (Abb. 25). Diese ist für die Partikelzusammensetzung einiger Mutanten besonders stark ausgeprägt (Abb. 26) und verhindert es, spezifische (eventuell) vorhandene Defekte zu identifizieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Assemblierung dieser Mutanten-Viruspartikel weniger präzise erfolgt.

Die genutzte Standardmethode der metabolischen Markierung (wie auch der Western Blot) ist nur semiquantitativ und wahrscheinlich zu ungenau, um die vermutlich nur kleinen Unterschiede zwischen Wt und Mutanten zu erfassen. Neuere, präzisere Methoden sind daher nötig, um geringe Unterschiede in der Proteinzusammensetzung zu identifizieren. Erschwerend kommt aber auch hinzu, dass Influenzaviren eine pleomorphe Gestalt aufweisen, was eine intrinsische Variation der Viruspartikelzusammensetzung nach sich zieht. Unter der Annahme, dass jedes (infektiöse) Partikel acht verschiedene RNP-Segmente besitzt⁴⁰, ist die Menge an NP-Molekülen (und auch PA, PB1 und PB2) in jedem Virion die gleiche. Da sich aber die Membranoberfläche in Partikeln verschiedener Morphologie unterscheidet, unterscheidet sich vermutlich auch die Menge der Membranproteine (und somit das Verhältnis von internen zu externen viralen Proteinen) zwischen einzelnen Virionen. Aufgrund dieser Unsicherheiten sind die hier gezeigten Resultate somit lediglich als Tendenz aufzufassen.

Die Ergebnisse der metabolischen Markierung deuten für **HA Ac1-Viren** auf eine leicht reduzierte **HA-Menge** hin (vgl. Abb. 26). Dies passt auch zum Ergebnis des M1-Western Blots von Proben dieser Viren, die auf den gleichen HA-Titer eingestellt waren (Abb. 27 A und B). Der M1-Gehalt war dort leicht erhöht, möglicherweise, weil durch eine reduzierte HA-Menge

von dieser Mutante mehr Viren für den Blot eingesetzt wurden. HA Ac1 wird somit im Einklang mit den Ergebnissen der FLIM-FRET-Messungen dieser Arbeit und mit verschiedenen anderen Studien^{57,121,184–187} möglicherweise weniger effizient zu Rafts rekrutiert und entsprechend in geringeren Mengen (als Wt-HA) in Viren eingebaut.

Defekte bei der Assemblierung und Knospung, die sich in reduzierten M1- und NP-Mengen äußerten, wurden indes für unteracyliertes H3-Subtyp-HA gefunden¹⁸⁷. Das Ergebnis der metabolischen Markierung der vorliegenden Arbeit zeigt für HA Ac1-Viren die Tendenz einer reduzierten **M1**-Menge, wohingegen die per Western Blot bestimmte Reduktion von M2/M1 entweder auf eine erhöhte M1-, oder eine reduzierte M2-Menge hindeutet. Die Ergebnisse lassen somit keine eindeutige Aussage bezüglich der M1-Menge zu. Eine verminderte Interaktion von HA Ac1 mit M1 wäre prinzipiell als Ursache für das reduzierte Wachstum der HA Ac1-Mutanten vorstellbar. Obwohl bisher keine direkte Interaktion zwischen M1 und HA nachgewiesen werden konnte, belegen einige Studien, dass HA von Influenza-A- und B-Viren im Zuge der Knospung funktionell mit M1 interagiert und es möglicherweise zur Knospungszone rekrutiert^{187,275}. Allerdings sind viele As-Seitenketten (oder die daran angehefteten Fettsäuren) des CP-HA-Bereiches vermutlich an der Interaktion mit der Lipidmembran (s. o.) beteiligt, so dass nur wenige für eine spezifische M1-Interaktion verfügbar wären. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einige dieser in Frage kommenden As (G557 und Q560, vgl. Abb. 36) substituiert werden können, ohne dass dies starke Effekte auf das Viruswachstum hat, was man aber für eine essenzielle M1-Kontaktstelle erwarten würde²⁶².

M1 besitzt als hydrophobes Protein die Kapazität partiell in Lipiddoppelschichten zu inserieren^{278–280} und könnte ebenso mit Aminosäuren des inneren (und variablen) Bereichs der HA-TMD interagieren²⁶². Diese Hypothese würde zudem erklären, warum die Expression von WSN-M1 die Herstellung von ansonsten letalen HA-Acylierungsmutanten des Udorn-Stammes ermöglicht¹⁸⁷ (vgl. Kap. 1.3.2). Aber auch die zwei essenziellen cytoplasmatischen Palmitoylierungen und Ac1 könnten mit der hydrophoben M1-Oberfläche interagieren. Dies könnte den Wachstumsdefekt in HA Ac1-Viren erklären. Alternativ könnten HA und M1 aber auch, statt über eine direkte Interaktion, indirekt zur Virusknospung beitragen, z.B. indem ihre CP-Bereiche die Fluidität der Plasmamembran verändern und eine stabile Knospungszone schaffen²⁶².

Chen *et al.*¹⁸⁷ fanden für Udorn-Viren mit unteracyliertem HA auch eine reduzierte **NP**-Menge. Diese war allerdings für Ac1-Viren kaum, für Ac2- und Ac3-Viren hingegen deutlich reduziert. Wie bereits diskutiert kann den Ergebnissen der metabolischen Markierung der vorliegenden Studie, bei der für HA Ac1-Viren die NP-Menge leicht erhöht war (vgl. Abb. 26B),

keine große Bedeutung beigemessen werden. Das Ergebnis der **qPCR** (Abb. 28) ergab für alle Viren mit HA Ac1 ein mit Wildtypviren vergleichbares HA/RNP-Verhältnis und somit vergleichbare NP-Mengen. Auf einen leichten Knospungsdefekt in den HA Ac1-Viren deutete indessen die **TEM** hin. Dort war die Tendenz dieser Viren, vermehrt filamentöse Partikel zu bilden, zu erkennen (Abb. 24B). Da es sich um einen schwachen Effekt handelt ist dieser jedoch schwer quantifizierbar.

Zusammenfassend zeigten weder die TEM von HA Ac1-Viruspartikeln, noch die Bestimmung ihrer Partikelzusammensetzung per metabolischer Markierung, Western Blot und qPCR eindeutige Unterschiede zu Wt-Viren auf. Die Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass HA Ac1-Viren einen leichten Defekt bei der Assemblierung und Knospung besitzen könnten, der auf eine reduzierte Fähigkeit von HA Ac1 mit Rafts zu interagieren, zurückgeführt werden könnte. Die FLIM-FRET-Messungen stützen dies (vgl. Kap. 4.1.1). Passend dazu konnte in einer anderen Arbeit für HA, in dem das zweite Raft-Assoziationsmotiv, die hydrophoben Aminosäuren VIL, zu Beginn der TMD zerstört war (VIL3A Mutante), gezeigt werden, dass es diffus an der Plasmamembran verteilt ist und Viren mit dieser HA-Variante eine verminderte Knospungseffizienz und HA-Inkorporation aufweisen^{59,122}.

Die Palmitoylierung der Fusionsproteine spielt auch in vielen anderen Viren eine bedeutende Rolle bei der Assemblierung von Viruspartikeln und der Bildung infektiöser Nachkommen. So weisen Coronaviren mit nicht bzw. unteracyliertem S-Protein^{281,282} oder HI-Viren mit unteracyliertem Env-Protein²⁸³ eine reduzierte Inkorporation des jeweiligen Proteins in Virus- oder virusähnlichen Partikeln und oft auch eine reduzierte Infektiosität auf.

Die Konzentration des HA in Rafts ist ferner aber auch für die HA-vermittelte **Membranfusion** (Kap. 1.3.1) von Wichtigkeit. So wurden für einige unteracylierte HA-Subtypen von Influenza-A- und B-Viren statt einem Knospungsdefekt Hinweise auf einen Defekt beim Eintritt in die Wirtszelle gefunden, der sich in einer Beeinträchtigung der Bildung und Stabilisierung der Fusionspore äußerte^{183,186,188,190} (vgl. Kap. 1.3.2). Es wird angenommen, dass die Acylierung in einem späten Schritt der Fusion die Organisation der Lipide in der Lipidschicht stört und so die Fusion und deren Vollendung erleichtern kann⁵². Sakai *et al.*¹⁸⁹ untersuchten vektorexprimiertes H1-Subtyp-HA (der gleiche Subtyp, wie in der vorliegenden Arbeit) mit fehlenden Acylierungen und fanden, dass die Fusion beim Schritt der Porenbildung gestört war. Ob HA Ac1-Viren einen Defekt bei der Fusion besitzen, könnte per Fusionsassay untersucht werden. Die Acylierung ist auch für die Fusionsaktivität der Proteine anderer Viren, beispielsweise das S-Protein von Coronaviren, von Wichtigkeit²⁸⁴. Allerdings

gibt es auch Virenstämme, deren Fusionsproteine von Natur aus nicht acyliert sind. So enthält der New Jersey-Stamm des Vesicular Stomatitisvirus ein nicht-acyliertes G-Protein²⁸⁵ und auch das Fusionsprotein von Sendaivirus (ein Paramyxovirus, der normalerweise acylierte Fusionsproteine besitzt) ist nicht acyliert. Das sind Indizien, dass die Fusion per se die Acylierung nicht benötigt⁵².

4.2 Acylierung und Cholesterol-Bindemotive von M2

4.2.1 M2s Acylierung und CRAC-Motive werden nicht für den apikalen Plasmamembrantransport benötigt

Bezüglich der Acylierung und CRAC-Motive von M2 (Abb. 20A rechts) wurde zunächst untersucht, ob diese Motive für den apikalen M2-Transport benötigt werden. Zugrunde lag die Tatsache, dass es sich bei ihnen um potenzielle Raft-Assoziationsmotive handelt und dass für den apikalen Transport von Lipiden und Transmembranproteinen eventuell ein Lipid-abhängiger Mechanismus existiert, der Rafts involviert (vgl. Kap. 1.2.3). Konfokalmikroskopische Aufnahmen polarisierter MDCKII-Zellen, die mit M2-GFP-wt oder M2-GFP-Varianten mit fehlender Acylierung und/oder zerstörten CRAC-Motiven transfiziert wurden, zeigten allerdings, dass auch diese M2-Varianten weiterhin eine apikale Lokalisation aufweisen (Abb. 13). Diese Motive werden somit nicht für den apikalen M2-Transport benötigt, obwohl sie per se das Potenzial besitzen, Proteine in Raft-ähnliche, apikale Transportvesikel zu inkorporieren. Während M2 auch über bisher unidentifizierte Motive mit Rafts interagieren und dennoch per Raft-abhängigem Mechanismus zur apikalen Plasmamembran transportiert werden könnte (s. a. Kap. 4.2.2), fanden Rossman *et al.*⁶⁹ interessanterweise, dass der Plasmamembrantransport von M2 (nicht aber der von HA) den apikalen Recyclingendosomen-Marker **Rab11** benötigt. D. h. es könnte für M2 ein komplexer, indirekter Transportweg zur apikalen Plasmamembran existieren. Rab11 ist ein kleines GTP-bindendes Protein mit verschiedenen Funktionen beim zellulären Membrantransport^{286,287}. Es ist an der Bildung von Endosomen sowie am Proteintransport zur apikalen Plasmamembran beteiligt und auch die viralen RNP-Komplexe werden, assoziiert mit Rab11-positiven Recyclingendosomen, entlang von Mikrotubulli-Netzwerken zur Knospungszone gebracht⁴⁰. Eine Reduktion der Rab11a/b Proteinlevel mittels siRNA führte in der Studie von Rossman *et al.*⁶⁹ zu einer signifikant reduzierten M2-Menge an der Zelloberfläche, was auf eine essenzielle Rolle von Rab11 für den M2-Transport zur apikalen Plasmamembran hindeutet.

4.2.2 Acylierung und CRAC-Motive von M2 sind nicht essenziell für die Assoziation mit stabilisierten Raft-Domänen

Um festzustellen, ob die Acylierung und Cholesterol-Bindemotive von M2, wie von Schroeder *et al.*²¹⁵ postuliert, für die Assoziation mit den (durch HA stabilisierten) Raft-Domänen benötigt werden, wurden FLIM-FRET-Messungen durchgeführt. Für Messungen von HA-Cer-wt in Kombination mit M2-YFP-Varianten ohne Acylierung und/oder zerstörten CRAC-Motiven wurden relative K_D -Werte erhalten, die im gleichen Bereich wie für die Kombination mit Wt-M2 liegen (vgl. Abb. 19) und darauf hindeuten, dass die beiden Proteine ungeachtet der fehlenden potenziellen M2-Raft-Lokalisationssignale clustern, schematisch dargestellt in Abb. 35B (Zusammenfassung der Ergebnisse der Clusteranalyse in Tab. 13). Dass die M2-HA-Interaktion in den Mutanten nicht einmal reduziert ist, steht im Widerspruch zu der von Schroeder *et al.*²¹⁵ aufgestellten Hypothese, laut der es sich bei diesen zwei Motiven um Raft-Lokalisationssignale handelt. Wie bereits einleitend erwähnt, wurde im Einklang mit dieser Hypothese in Modellmembransystemen (GPMVs) die Acylierung dafür benötigt, M2 zur Raft-Domäne zu bringen²¹⁸. Wohingegen andere Untersuchungen ergaben, dass diese Motive im viralen Kontext von keiner großen Bedeutung sind (Kap. 1.4.2). Ebenso hat das Entfernen der Acylierung im Ionenkanalprotein CM2 von Influenza-C-Viren keinen signifikanten Einfluss auf die Virusreplikation²⁷⁷ (vgl. Abb. 37B).

Für eine nicht so essenzielle Funktion der potenziellen Raft-Lokalisationssignale von M2 spricht auch, dass die beiden Motive nicht absolut konserviert sind. Die Influenza A M2-Sequenzen, sortiert nach der Identität von Aminosäure 50 und dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von CRAC-Motiven, zeigt Tab. 14. Die Mehrheit der M2-Sequenzen enthält zwar eine Acylierung und mindestens ein CRAC-Motiv, aber knapp 14 % von 18.477 analysierten M2-Sequenzen enthalten kein Cystein an Position 50. In H1N1-Stämmen ist es oft durch Serin, in anderen Stämmen durch große, aromatische Aminosäuren, wie Phenylalanin oder Tyrosin, ersetzt. Knapp 2 % der analysierten Sequenzen weisen kein CRAC-Motiv auf. Allerdings schlossen Thaa *et al.*²¹⁶ nicht aus, dass diese M2-Proteine, die meistens noch eines der zentralen Tyrosine des CRAC-Motivs besitzen, möglicherweise dennoch in vermindertem Ausmaß Cholesterol binden können. Sie vermuteten, dass dafür auch die Proteinkonformation und nicht nur die lineare Aminosäuresequenz von Bedeutung sind. Einige, wenige (36) natürlich vorkommende Influenzastämme, die ausschließlich zum Subtyp H1N1 gehören, besitzen indes keines der beiden Motive.

CRAC vorhanden	C50	S50	F50	Y50	andere	gesamt
ja	15522 (84,0%)	2035 (11,0%)	407 (2,2%)	92 (0,5%)	6 (0,0%)	18062 (97,8%)
nein	357 (1,9%)	58 (0,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	415 (2,2%)
gesamt	15879 (85,9%)	2093 (11,3%)	407 (2,2%)	92 (0,5%)	6 (0,0%)	18477 (100,0%)

Tab. 14: Influenza A M2-Sequenzen erhalten von der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sortiert nach der Identität von As 50 und dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von CRAC-Motiven. Entnommen aus Thaa *et al.*²¹⁶.

Da das Knospen von Inflenzaviren ein komplexer und teilweise redundanter Prozess ist, liegt die Vermutung nahe, dass im viralen Kontext andere Proteine Defekte des M2 kompensieren können. Ein geeigneter Kandidat dafür ist das Matrixprotein **M1**, der Hauptorganisator der Assemblierung. Es bindet an die C-terminalen Aminosäuren 71-73 des M2⁶⁷ (und wahrscheinlich auch im C-terminalen Bereich von HA und NA⁵⁴) und ist essenziell für die Herstellung infektiöser Viren^{70,288,289}. Passend dazu konnten Chen *et al.*⁶⁷ zeigen, dass eine zerstörte M1-Bindestelle im M2 das HA-M2-Clustern in virusinfizierten Zellen reduziert.

Dass M2 mit fehlender Acylierung und zerstörten CRAC-Motiven in den FLIM-FRET-Messungen der vorliegenden Arbeit, also unabhängig von anderen viralen Proteinen, mit HA clustert, könnte darauf hindeuten, dass zelluläre Komponenten die Assoziation von M2 mit der Knospungszone vermitteln. Möglicherweise spielt das **Aktin-Cytoskelett** eine Rolle (vgl. Abb. 35A und B). Dieses erweist sich zunehmend als essenziell für die laterale Organisation speziell sphingolipidreicher Membrandomänen^{97,290,291} und ist auch an der Organisation der viralen Knospungszone und möglicherweise der Membrandeformation, besonders bei filamentösen Viren, beteiligt^{58,292}. Im Zuge der Infektion scheint eine funktionale Verbindung zwischen Cytoskelett und Membran-Rafts zu bestehen. Die pharmakologische Zersetzung des Cytoskeletts, beispielsweise mit Cytochalasin D, bewirkt eine Umverteilung des HA⁶⁹ und FLIM-FRET-Messungen vorheriger Studien zeigten ebenso, dass das Clustern des HA mit dem Raft-Marker oder M2 entscheidend von der Unversehrtheit des Aktin-Cytoskeletts abhängt^{94,121,217} (s. Tab. 13). Darüber hinaus ergab die Beobachtung von HA-Clustern per Fluoreszenz-Photoaktivierungs-Lokalisationsmikroskopie, dass diese durch das Aktin-Cytoskelett geformt werden²⁹³. Die Verbindung zwischen M2, dem Aktin-Cytoskelett und der Knospungszone könnte das zelluläre Protein **Annexin A6** sein. Für dieses zeigten Ma *et al.*²⁹⁴, dass es mit (cholesterolreichen) Membranbereichen assoziiert, das kortikale Aktin-Cytoskelett stabilisiert und zudem im CP-Bereich von M2 bindet, eine Interaktion, die die Virusknospung negativ reguliert. Nicht zuletzt könnte M2 aber auch ein bisher unbekanntes, intrinsisches Raft-Lokalisationssignal besitzen. Vorstellbar wäre, dass die **M2-TMD**, die mit 19 Amino-

säuren (vs. 27 As im HA) möglicherweise zu kurz ist, um mit den im Vergleich zur restlichen Membran dickeren Rafts zu interagieren, für seine Lokalisation an der Raft-Peripherie und/oder der apikalen Plasmamembran wichtig ist. Um dies zu untersuchen könnte die TMD um einige hydrophobe Aminosäuren verlängert und die Lokalisation dieser M2-Variante in polarisierten Zellen analysiert werden. Weiterhin sollte in FLIM-FRET-Messungen die Assoziation einer solchen M2-Variante mit dem Raft-Marker und mit HA-Cer untersucht werden. Kürzlich wurde per Elektronenmikroskopie an Plasmamembranblättern gezeigt, dass die Substitution von zwei bis fünf hydrophoben Aminosäuren im Bereich der **amphiphilen Helix** im CP-Bereich des M2 zu einem reduzierten HA-M2-Clustern und zu ausgeprägten Wachstumsdefekten führt²²⁴. Ob die AH selbst als intrinsisches Lokalisationssignal für den apikalen Transport und/oder die Raft-Assoziation von M2 dient, sollte daher auf jeden Fall auch untersucht werden.

4.3 Zwischen der Acylierung von HA und M2 existiert eine Synergie

In der vorliegenden Arbeit wurde auch untersucht, ob ein synergistischer Effekt zwischen den Acylierungen von HA und M2 existiert. Diese Frage ergab sich aus der Tatsache, dass im Gegensatz zu den HA-Acylierungsmutanten (vgl. Kap. 4.1), M2-Acylierungsmutanten zwar *in vitro*, nicht aber in der Zellkultur Beeinträchtigungen im Vergleich zum Wildtyp aufweisen^{216,218} (s. Abb. 37B). Möglicherweise werden also im Kontext der Infektion die Effekte der fehlenden M2-Acylierung durch HA, dem zweiten acylierten Influenzavirusprotein, kompensiert. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden rekombinante Viren mit fehlender Acylierung in M2 (C50S) und Viren mit einer Kombination aus unteracyliertem HA (C554S, Ac1) und nicht-acyliertem M2 hergestellt und charakterisiert (Abb. 20B).

Die in dieser Arbeit hergestellten Viren mit fehlender Acylierung in M2 (**M2 C50S-Viren**) wuchsen, im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien^{68,222} (Abb. 37B), wie Wildtypviren und wiesen laut metabolischer Markierung und Western Blot keine signifikanten Unterschiede in ihrer Partikelzusammensetzung auf (s. Abb. 21A und Abb. 26). Während die gleichen Viren in der Studie von Thaa *et al.*²¹⁶ vergleichbar wuchsen, wurde dort mit denselben Methoden gezeigt, dass mehr als die doppelte M2 C50S-Menge in Viruspartikel inkorporiert wird. Als Ursache dafür vermuteten die Autoren eine veränderte Lokalisation des M2-Proteins im Zuge der Knospung. Da die Methode des Western Blots und die Bandenquantifizierung anhand des Chemilumineszenzsignals nur semiquantitativ sind²⁹⁵ könnte dies sowie

natürliche Schwankungen, bedingt durch äußere Einflüsse, eine Erklärung für den beobachteten Unterschied sein.

Die **Acylierungs-Doppelmutante** (HA Ac1 + M2 C50S) zeigte, verglichen mit HA Ac1-Viren, eine weitere Wachstumsreduktion um eine Titerstufe sowie eine initiale Wachstumsverzögerung (Abb. 21A). Folglich scheint die Acylierung beider Proteine für den gleichen Schritt des viralen Replikationszyklus wichtig zu sein, d. h. es liegt eine funktionelle Kopplung vor. Die Koinfektion von MDCKII-Zellen mit jeweils einer der beiden Mutanten und Wt-Viren ergab weiterhin, dass HA Ac1-Viren gegenüber dem Wildtyp weitaus weniger beeinträchtigt sind, als HA Ac1 + M2 C50S-Viren, bei denen der Wildtyp schneller dominierte (Abb. 23). Besonders deutlich wurde dies bei der Infektion frischer MDCKII-Zellen mit dem aus der 1:1 Koinfektion erhaltenem Überstand. Dort wurde die Doppel-, nicht aber die Einzelacylierungsmutante schnell vom Wildtyp überwachsen (Abb. 23C). In einem vergleichbaren Kompetitionsexperiment zeigten Thaa *et al.*²¹⁶, dass M2 C50S-Viren gegenüber dem Wildtyp keinen Wachstumsnachteil besitzen. Die Doppelmutante besitzt somit eine eindeutig reduzierte Fitness gegenüber Wt-Viren, wohingegen die Einzelmutante M2 C50S eine dem Wildtyp vergleichbare und die Einzelmutante HA Ac1 nur eine leicht reduzierte Fitness besitzt.

Die verminderte Fitness der Doppelmutante ist vermutlich ihrer initialen Wachstumsverzögerung geschuldet (vgl. Abb. 21A), die in einer reduzierten Infektiosität begründet sein könnte. Dies könnte durch eine beeinträchtigte Fusionsaktivität des HA oder durch einen Defekt des M2-Protonenkanals bedingt sein. Allerdings beeinflusst der Verlust der M2-Palmitoylierung weder die Ionenkanalaktivität²⁹⁶, noch die Produktion infektiöser Partikel von Influenza-A- oder C-Viren^{221,277} (Abb. 37B) und es ist unklar, wie das gleichzeitige Fehlen einer Acylierung in HA und M2 solche Defekte hervorrufen könnte. Zudem wurde per Plaque-test die Menge infektiöser Viren in den für die Wachstumskurven eingesetzten Überständen angepasst. Daher sollte, würde der Defekt ausschließlich die Infektiosität betreffen, die Wachstumskurve initial vergleichbar mit der des Wildtyps sein. Naheliegender ist die Annahme, dass der vermutlich bereits in HA Ac1 vorliegende (Assemblierungs- und/oder Knospungs-) defekt in der Doppelmutante weiter verstärkt wird und folglich pro Infektionszyklus weniger infektiöse Viren hergestellt werden, die für die Infektion frischer MDCKII-Zellen zur Verfügung stehen.

Um zu überprüfen, ob das Clustern zwischen HA Ac1 und M2 C50S im Vergleich zu Wt-M2 weiter reduziert ist (also auch hier ein synergistischer Effekt detektierbar ist), wurden **FLIM-FRET-Messungen** durchgeführt. Diese ließen jedoch keinen signifikanten Unterschied, son-

dern lediglich die Tendenz eines reduzierten Clusters zwischen unteracyliertem HA und nicht-acyliertem M2 vs. Wt-M2 erkennen (vgl. Abb. 18). Genauso zeigen die **TEM**-Bilder (Abb. 24B) nur die Tendenz eines Knospungsdefektes: HA Ac1 + M2 C50S-Viren neigen dazu, etwas mehr elongierte Partikel und zudem perlenschnurartige Formen zu bilden als der Wildtyp und möglicherweise auch als HA Ac1-Viren. Die Ergebnisse der **metabolischen Markierung** und des **Western Blots** (Abb. 26 und 27) sowie der **qPCR** (Abb. 28) lassen indes keinen signifikanten Unterschied in der Zusammensetzung der Doppelmutante gegenüber HA Ac1- und M2 C50S-Viren sowie zum Wildtyp erkennen. Insgesamt ist der Defekt den die Doppel- gegenüber den Einzelacylierungsmutanten von HA oder M2 besitzt vermutlich nur ein sehr geringer, der schwer zu identifizieren ist.

Wie bereits in Kap. 4.1.1 erklärt, wird grundsätzlich angenommen, dass M2 mit Membranamikrodomänen assoziiert, die durch HA in Abhängigkeit von dessen Raft-Lokalisationsmotiven organisiert werden (vgl. Abb. 35). Folglich handelt es sich um eine **indirekte HA-M2-Interaktion**, die vermutlich eher schwach ist. Dafür spricht auch, dass nur geringe M2-Mengen in Viren enthalten sind²¹⁹. Wie in der vorliegenden Arbeit per FLIM-FRET-Messungen gezeigt wurde, sind für die Interaktion mit Wildtyp-HA (bzw. mit den gebildeten stabilen Raft-Domänen) zumindest in Zellen, die HA und M2 exprimieren, weder die Acylierung noch Cholesterol-Bindemotive von M2 erforderlich. Dagegen sind HAs Acylierungen für das Clustern mit M2 notwendig und bereits das Fehlen von Ac1 reduziert die HA-M2 Interaktion stark (vgl. Tab. 13).

Thaa *et al.*²¹⁶ stellten die Hypothese auf, dass die M2-Acylkette die Transmembranhelix relativ zur Membran umorientieren und so deren effektive Länge reduzieren könne. Dies könnte die M2-Lokalisation am Rand von Rafts bzw. in der im Vergleich zu Rafts dünneren L_d -Phase der Plasmamembran begünstigen. Eine fehlende Acylierung würde demnach die effektive Länge der M2-TMD erhöhen und so die Interaktion mit den dickeren Raft-Domänen steigern. Basierend auf dieser Theorie könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wie folgt interpretiert werden: Bilden sich durch HA Ac1 weniger stabile Raft-Domänen, so ist M2 C50S möglicherweise unspezifischer verteilt, da es, mehr als Wt-M2, zur Interaktion mit den stabilen Raft-Domänen tendiert, deren Bildung jedoch gestört ist. Alternativ interagiert M2 C50S selbst, mehr als Wt-M2, auch mit nicht-stabilisierten Rafts, HA Ac1 hingegen nicht mehr so stark. Das Clustern wäre reduziert. Um dies zu testen könnten FLIM-FRET-Messung zwischen M2 C50S und dem Raft-Marker durchgeführt werden.

Andererseits kann die Acylierung von membrannahen Cysteinen auch die effektive (hydrophobe) Länge von TMD erhöhen und so die Fähigkeit eines Proteins steigern, mit den dickeren Membran-Raft-Bereichen zu interagieren²⁹⁷. Das reduzierte Wachstum der Acylierungsdoppelmutante gegenüber HA Ac1-Viren ließe sich dann damit erklären, dass HA Ac1 zu weniger stabil organisierten Raft-Domänen führt, mit denen Wt-M2 dennoch (wenn auch schwächer) assoziieren kann, nicht-acyliertes M2 hingegen weniger. Das Clustern zwischen HA Ac1 und M2 C50S wäre weiter reduziert.

Bei einer veränderten Interaktion von M2 C50S mit Rafts, und somit der Knospungszone, würde man einen Unterschied bzgl. der in Viren enthaltenen M2 C50S-Menge erwarten. Diese war jedoch in der vorliegenden Studie für alle Mutanten vergleichbar (Abb. 27 C und D), was daran liegen könnte, dass der Effekt nur sehr klein und per Western Blot nicht detektierbar ist.

Eine **direkte HA-M2-Interaktion** konnte bislang nicht nachgewiesen werden und erscheint eher unwahrscheinlich. Basierend auf der Tatsache, dass das F-Protein von Sendaiviren in Influenzaviren inkorporiert wird, wenn es die Ektodomäne des M2-Proteins besitzt, stellten Park *et al.*²⁹⁸ die Hypothese auf, dass die Ektodomänen von M2 und HA miteinander interagieren und dies zu einer spezifischen M2-Inkorporation führen könne. Allerdings wurde in den letzten Jahren, und auch in der vorliegenden Arbeit, vor allem durch FLIM-FRET-Messungen gezeigt, dass die HA-M2-Interaktion in Membranen durch Änderungen, die nicht die Ektodomäne, sondern die Raft-Assoziationsmotive des HA betreffen, bereits stark reduziert wird. Das spricht, wie schon Thaa¹⁰¹ vermutete gegen eine (hoch-) spezifische Assoziation der Ektodomänen beider Proteine. Andererseits ergab die Elektronenmikroskopie infizierter Zellen, dass das Clustern von HA, M1 und M2 an Plasmamembranen nach einem Austausch der M1-Bindestelle im M2 zwar reduziert, aber dennoch vorhanden war⁶⁷, so dass dieses Clustern durch eine intrinsische HA-M2-Wechselwirkung bedingt sein könnte¹⁰¹. Um das Vorliegen einer direkten HA-M2-Interaktion zu prüfen, könnte versucht werden eine Koimmunpräzipitation beider Proteine herbeizuführen. Außerdem wäre es interessant zu untersuchen, wie sich HA Ac1 + M2 C50S-Viren im Mausmodell verhalten, da für M2 C50S-Viren dort, im Gegensatz zur Zellkultur mit verschiedenen Zelltypen, die Replikation mäßig beeinträchtigt war (10-fache Erhöhung der 50 % letalen Dosis (LD₅₀)²²².

Während M2-CRAC-Motiv-Mutanten in der Zellkultur vergleichbar wie Wildtypviren wachsen²¹⁶, deuten *in vitro* Untersuchungen auf eine Rolle der CRAC-Motive für die Membranassoziation des CP-M2-Bereiches hin²¹⁸. Daher wurde zusätzlich untersucht, ob die Zerstörung

der M2-CRAC-Motive in Kombination mit HA Ac1 das Wachstum der Viren beeinträchtigt. Dies war nicht der Fall (Abb. 21B). Überraschenderweise wuchsen auch **HA Ac1 + M2 C50S,CRAC-Viren** vergleichbar wie HA Ac1-Viren und zeigten weder die initiale Wachstumsverzögerung, noch die Titerreduktion um zwei log-Stufen, wie sie für HA Ac1 + M2 C50S-Viren auftrat (vgl. Abb. 21B). Zur Erstellung der Wachstumskurve wurden jeweils zwei verschiedene Virusbestände verwendet, die unabhängig voneinander mittels des reversen Genetiksystems von Hoffmann *et al.*²²⁶, basierend auf acht Plasmiden, hergestellt wurden. Die Plasmide mit der Mutation HA Ac1 und für die restlichen viralen Proteine waren somit immer dieselben. Die Plasmide mit dem M-Segment wurden vor und am Ende der Wachstumsanalyse vollständig sequenziert und die Sequenz war, bis auf die gewünschte(n) M2-Mutation(en), identisch mit der des Wildtyps. Folglich muss die Aufhebung des beobachteten Wachstumsdefekts in HA Ac1 + M2 C50S,CRAC-Viren eine biologische Ursache haben. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde kein Anhaltspunkt für eine Erklärung gefunden.

4.4 Die amphiphile Helix von M2

Im letzten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der cytoplasmatischen amphiphilen M2-Helix untersucht, die nach dem Modell von Rossman *et al.*⁶⁹ sehr wichtig für die Abschnürung der Nachkommenviren von der Wirtszelle ist (Kap. 1.4.2).

4.4.1 Viren ohne M2 oder mit Deletion der AH können nicht hergestellt werden

Basierend darauf, dass in früheren Arbeiten Influenzaviren ohne M2 hergestellt werden konnten (s. u.), Viren mit einer Deletion der AH aber noch nie beschrieben wurden, wurde hier zunächst versucht infektiöse WSN-Viren ohne funktionelles M2 oder mit deletierter Helixsequenz per reverser Genetik zu generieren (vgl. Abb. 31).

Viren **ohne M2** (Δ M2-Viren) konnten nicht hergestellt werden. Dies ist insofern nicht überraschend, da M2 wichtig für mehrere Schritte des viralen Lebenszyklus ist (s. Kap. 1.4.1). Seine Protonenkanalaktivität wird für den Viruseintritt in die Wirtszelle benötigt und besonders der CP-Bereich ist für die Produktion infektiöser Viren maßgebend. In verschiedenen Studien konnten zwar Viren der Stämme WSN bzw. Udorn ohne M2²⁹⁹, mit M2_70-Stopp (eine M2-Variante die vergleichbar einer M2-Deletion ist⁷⁰) oder Viren mit verkürzten M2-Varianten^{67,288} hergestellt werden, jedoch wurden für die Vermehrung M2CK-Zellen genutzt, die konstitutiv Wildtyp-M2 exprimieren. Auch die Titerbestimmung per Plaquetest erfolgte

auf M2CK-Zellen, da die Viren auf herkömmlichen MDCK-Zellen stark attenuiert waren. In der Arbeit von Watanabe *et al.*²⁶⁶ wurden Udorn-Viren ohne funktionelles M2 wie in der vorliegenden Arbeit hergestellt, indem hinter dem Leserahmen für das M1-Protein zwei Stoppkodons generiert wurden (Abb. 30). Allerdings wurde zur Herstellung dieser Viren das reverse Genetiksystm von Neumann *et al.*³⁰⁰ verwendet und zusätzlich zu den acht Plasmiden mit der genetischen Information für je ein virales Genomsegment, Expressionsplasmide für alle Strukturproteine, einschließlich Wt-M2, transfiziert. Die so erhaltenen Δ M2-Viren zeigten ein stark reduziertes Wachstum in der Zellkultur und keine Replikation im Mausmodell. Auch Δ M2-PR8-Viren waren auf MDCK-Zellen sowie in Mäusen stark attenuiert und wurden als potentieller Kandidat für einen Lebendimpfstoff eingestuft³⁰¹. M2 scheint für Influenzaviren somit von großer Bedeutung, aber nicht absolut essenziell zu sein. Das in der vorliegenden Arbeit keine Δ M2-Viren hergestellt werden konnten, liegt vermutlich daran, dass diese in ihrer Replikation zu stark beeinträchtigt sind. Es ist daher günstig, zur Herstellung zusätzlich Wt-M2 zu exprimieren und die erhaltenen Δ M2-Viren auf M2CK-Zellen zu vermehren. Auch die Durchführung des Plaquetests zur Titerbestimmung auf M2CK-Zellen bietet den Vorteil, dass die Viren schneller wachsen und die Plaques besser erkannt werden.

Viren mit einer kompletten **Deletion der cytoplasmatischen M2-Helixsequenz** (Δ AH-Viren) wurden bisher nicht hergestellt und dies gelang auch in der vorliegenden Studie nicht. Da sowohl die Acylierung als auch die CRAC-Motive innerhalb der Helix für das Viruswachstum unwesentlich sind (Ref. 216 und Quellen darin) könnte das bedeuten, dass die AH, wie postuliert, für die Knospung sehr wichtig ist. Man sollte auch hier versuchen Δ AH-Viren durch die zusätzliche Expression von Wt-M2 herzustellen und die Propagation und Plaquetest zur Titerbestimmung auf M2CK-Zellen durchführen. Werden trotzdem keine Viren erhalten, oder würden diese sehr schlecht wachsen, unterstriche dies die Wichtigkeit der Helix. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Deletion der Helixsequenz essenzielle **Verpackungssignale** im genomischen RNA-Segment sieben zerstört wurden (Übersicht in Ref. 14) oder, dass die Verkürzung des M-Segments die Verpackung beeinträchtigt³⁰² und deswegen keine infektiösen Viren hergestellt werden können. Des Weiteren befinden sich für die **Inkorporation der M1-vRNP-Komplexe** essenzielle Bereiche des C-Terminus nur wenige Aminosäuren hinter der AH (As 71-73⁶⁷). Die Deletion von 17 As könnte die Sekundärstruktur des CP-Bereiches verändern und die Interaktion mit M1 reduzieren. Alternativ könnte ein Konstrukt generiert werden, in dem die gesamte Helixsequenz durch Aminosäuren wie Alanin und/oder Glycin ersetzt wird, die keine Helix mehr bilden. Allerdings ist auch hier

das Risiko hoch, dass Sekundärstruktur und Funktion des CP-Bereiches dadurch zu stark beeinträchtigt werden. Eine M2-Variante mit gescrambelter Helixsequenz sowie Varianten, in denen mehrere hydrophobe As der Helix substituiert waren, wurden in dieser und anderen Studien bereits untersucht (s. Kap. 4.4.3). Diese Varianten bilden allerdings höchstwahrscheinlich noch eine Helix aus. Die **Protonenkanalaktivität** von M2 könnte durch eine Deletion der AH zwar vermindert sein, jedoch ist es eher unwahrscheinlich, dass dies die Ursache dafür ist, dass keine Viren hergestellt werden können. Ma *et al.*¹⁹⁹ zeigten, dass ein die TMD umfassendes Peptid (As 22-46) prinzipiell ausreicht, um Protonen in Liposomen zu befördern, und dass die AH vermutlich über eine Stabilisierung der tetrameren TMD die Protonenleitfähigkeit erhöht. Auch Tobler *et al.*¹⁹⁸ fanden stärkere Effekte auf die Protonenkanalaktivität nur in stark verkürzten M2-Varianten und führten dies auf eine reduzierte Oberflächenexpression dieser M2-Varianten zurück. Eine reduzierte **Oberflächenexpression**, wie sie auch Ma *et al.*¹⁹⁹ und McCown & Pekosz⁷⁰ für verkürzte M2-Varianten beobachteten, könnte prinzipiell auch der Grund sein, dass keine M2-ΔAH-Viren hergestellt werden konnten. Möglicherweise ist nicht mehr ausreichend M2 an der Knospungszone vorhanden, um die Viren von der Wirtszelle abzuschnüren. Allerdings zeigten McCown & Pekosz⁷⁰ auch, dass Viren mit M2-Varianten mit geringer Oberflächenexpression dennoch erfolgreich hergestellt werden können und wie Wildtyp wachsen. Folglich werden nur sehr geringe M2-Mengen für die Produktion infektiöser Viren benötigt.

4.4.2 Die AH kann durch andere amphiphile Helices teilweise funktionell ersetzt werden

Um Hinweise auf die Funktion der amphiphilen M2-Helix zu gewinnen wurden in der vorliegenden Arbeit mittels reverser Genetik erstmals Viren hergestellt, in denen die komplette Helix ausgetauscht und durch gut charakterisierte krümmungsdetektierende oder modulierende Helices ersetzt wurde (Abb. 31B). Interessanterweise konnten für alle drei M2-Varianten mit substituierter Helix rekombinante WSN-Viren hergestellt werden. Dies lässt zunächst die Schlussfolgerung zu, dass die exakte Sequenz der Helix nicht essenziell ist.

Rekombinante Viren mit M2, welches die krümmungsdetektierende Helix des **ALPS**-Motivs des Golgi-assoziierten Proteins ArfGAP1 enthält, wuchsen nur etwa zwei Titerstufen schlechter als der Wt (Abb. 32A). Dies könnte ein Hinweis sein, dass auch die Wt-M2-Helix die Membrankrümmung detektiert und dazu dient, M2 am stark gekrümmten Hals knospender Viren zu lokalisieren, wo es für die Abspaltung benötigt wird. Über die Detektion der Membrankrümmung könnte auch der Zeitpunkt der Helixinsertion und somit der finalen Abschnü-

rung von der Wirtszelle bestimmt werden. Im Einklang damit zeigten Wang *et al.*²⁶⁷ in einer Festkörper-NMR-Studie, dass M2 bevorzugt an stark gekrümmte Membranen bindet.

Viren mit M2, mit der Helix von **Epsin**, die in flache Membranen inseriert und diese zu krümmen und tubulieren vermag¹⁴², als auch Viren in denen die M2-Helix durch das artifizielle Peptid **RW16** ersetzt wurde, welches die Fähigkeit zur GUV-Tubulation besitzt^{69,270}, konnten ebenfalls erfolgreich hergestellt werden. Die RW16-M2-Variante, deren Helix das stärkste hydrophobe Moment aller M2-Helix-Varianten aufweist (vgl. Tab. 15), wuchs von den hergestellten Mutanten am besten (Abb. 32A). Daher ist man geneigt anzunehmen, dass die primäre Bedeutung der Helix in der Abspaltung der Viren von der Wirtszelle liegt. Dabei würde die Helixinsertion zu einer Membrankrümmung und erhöhten Linienspannung am Hals der knospenden Viren führen und so die Energie für die Abspaltung liefern. Dazu passt auch, dass laut Rossman *et al.*⁶⁹ bereits ein Wt-M2-Helixpeptid (der Stämme Udorn, als auch WSN) ausreicht um GUVs zu tubulieren. Der krümmungsinduzierende Effekt war in jener Arbeit abhängig vom Membrancholesterolgehalt und fand bei verhältnismäßig geringen Cholesterolkonzentration von maximal 17 %, nicht jedoch bei Konzentrationen von 40 % statt. Auch die Resultate aktueller Untersuchungen deuten auf diese Funktion der amphiphilen Helix hin. So zeigten Wang *et al.* 2015³⁰³ mittels Festkörperkernspinresonanz an Bicellen, dass die Helix allein die Fähigkeit verleiht, eine hochgekrümmte Membranphase in Raft-Lipidhaltigen Membranen zu generieren. Passend dazu zeigten Schmidt *et al.*¹²⁶ mittels hochauflösender Kleinwinkelröntgenstreuung, dass die M2-AH eine negative Gauß-Krümmung erzeugen kann.

M2-Variante	μH	Viruswachstum
Wt (WSN)	0,397	+++++
Gescrambelt (WSN)	0,071	keine Viren
Gescrambelt (Udorn)	0,342	+
ALPS	0,352	+++
Epsin	0,588	+
RW16	0,991	+++(+)
5-Ala-Mutante ⁶⁸	0,229	+

Tab. 15: Hydrophobes Moment der M2-Helix-Varianten und Wachstum der korrespondierenden Viren in Zellkultur. Das hydrophobe Moment (μH , ermittelt per Heliquest²²⁹) der Helix im CP-Bereich von M2, gebildet von den As 46-62 (Wt und gescrambelte Varianten) bzw. von den neu inserierten As ist als Maß für die jeweilige Helix-Amphiphilität angegeben. Viruswachstum in der Mehrschritt-Wachstumskurve: +++++ = wie Wt, ein Pluszeichen weniger bedeutet eine Wachstumsverschlechterung um etwa eine Titerstufe, (+) = eine halbe Titerstufe.

Dass Viren mit der M2-Epsin-Variante und solche mit M2-Gescrambelt (Udorn) in der Mehrschritt-Wachstumskurve trotz erhöhter bzw. mit dem Wt vergleichbarer Amphiphilität schlecht wachsen (Tab. 15), könnte eine reduzierte Virusstabilität (s. u.) oder für M2-Gescrambelt (Udorn) die in Kap. 4.4.3 diskutierten Gründe als Ursache haben.

Es fällt generell auf, dass die Viren mit den drei M2-Varianten initial genauso gut wachsen wie der Wildtyp, die Wachstumskurve jedoch für M2-Epsin und M2-ALPS bereits 16 und für

M2-RW16 24 h nach der Infektion (mit kleiner m.o.i. und somit mehreren durchlaufenen Replikationszyklen) stark abflacht (Abb. 32A). In einer Einschnitt-Wachstumskurve (mit hoher m.o.i., und somit nur einem durchlaufenen Replikationszyklus) ist die Wachstumskinetik der Mutanten allerdings vergleichbar der des Wildtyps (Abb. 32B). Für diesen beobachteten Unterschied kommen prinzipiell mehrere Gründe in Frage. Da die Epsin- und RW16-Helix ein signifikant größeres hydrophobes Moment als die Wt-M2-Helix besitzen (Tab. 15), war es vorstellbar, dass diese M2-Varianten einen **cytotoxischen Effekt** auf die Wirtszelle ausüben, indem sie Membranen tubulieren und so die effektive Produktion neuer Viren behindern. Ein Zellvitalitätstest bestätigte dies allerdings nicht. Für die M2-RW16-Variante war lediglich ein geringer, nicht signifikanter cytotoxischer Effekt erkennbar (Abb. 33). Dies stimmt mit Ergebnissen von Lamaziere *et al.*²⁷⁰ überein, die das RW16-Peptid hinsichtlich dessen Cytotoxizität charakterisierten und zeigten, dass es für Zellen nicht cytotoxisch ist.

Eine verminderte **Plasmamembranlokalisation** und speziell eine reduzierte Lokalisation an der Knospungszone und/oder abgeschwächte Interaktion mit dieser könnte das schlechtere Wachstum der Mutanten in der Mehrschritt-Wachstumskurve verursachen. Erste Experimente, in denen Zellen mit Expressionsplasmiden für RFP-markierte M2-Varianten transfiziert und anschließend die Lokalisation der M2-Proteine konfokalmikroskopisch analysiert wurde, ergaben, dass alle drei Varianten mit modifizierter Helix schlechter an die Plasmamembran gebracht werden als Wt-M2. Ein großer Anteil der jeweiligen M2-Variante scheint an cytoplasmatischen Membranen, wie dem Golgi oder ER, lokalisiert zu sein (nicht gezeigt). Dies müsste aber ausführlicher untersucht werden. Die Analyse der Viruspartikel per Western Blot ergab, dass die **M2-Menge** in Viren mit M2-Epsin und M2-RW16 deutlich reduziert ist, wohingegen Viren mit der M2-ALPS-Variante eine mit Wildtypviren vergleichbare M2-Menge aufweisen (Abb. 34B). Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass die ALPS-Helix im M2, wie die Wt-M2-Helix, die Membrankrümmung detektiert und so für eine korrekte M2-Positionierung und -Inkorporation in die Nachkommenviren sorgt und das dies in den anderen M2-Mutanten gestört ist. Die Lokalisation der M2-Varianten könnte in phasenseparierten GUVs oder durch elektronenmikroskopische Analyse von Dünnschnitten infizierter Zellen untersucht werden. Dabei sollte man auch testen, ob die M2-Helixmutanten in polarisierten MDCKII-Zellen noch apikal lokalisiert sind und per FLIM-FRET-Messungen, ob sie noch mit HA clustern, d. h. mit der durch HA-organisierten Knospungszone assoziieren.

Eine weitere Erklärung für das verminderte Wachstum der Viren mit M2-Helixmodifikation wäre eine gestörte **Interaktion mit** anderen viralen Proteinen, beispielsweise **M1** (möglicherweise auch HA). Allerdings liegt die M1-Interaktionsstelle hinter der amphiphilen Helix⁶⁷

und alle hier untersuchten Viren enthalten bezogen auf den HA-Titer in etwa gleich viel M1 wie Wildtypviren (vgl. Abb. 34A). Die Inkorporation von M1 in Viren mit defekten M2-Varianten könnte aber über die Wechselwirkung mit anderen viralen Proteinen (HA, NA) erfolgen. Mittels eines „Pulldown-Assays“ könnte getestet werden, ob die Interaktion zwischen M1 und den M2-Varianten reduziert ist, da beide Proteine normalerweise koprezipitieren⁶⁷. Auch sollte die Menge anderer viraler Proteine, wie HA, in den Viruspartikeln der Mutanten bestimmt werden.

Schließlich könnte die Ursache der plötzlich auftretenden Titerreduktion in der Mehrschritt-Wachstumskinetik der Mutanten auch deren relativ zu Wt-Viren geringere **Stabilität** sein, die mit einem Verlust der Infektiosität einhergehen würde. Nach der Freisetzung aus der Wirtszelle, während ihrer Verbreitung durch die Luft, sind Viren in der Umwelt schwankenden Luftfeuchtigkeiten und Temperaturen ausgesetzt. Eine optimale Lipidzusammensetzung der Virushüllmembran ist dann wichtig, damit diese stabil ist und die Viren infektiös bleiben¹²³. Besonders auffällig ist, dass für M2-Epsin-Viren 96 h.p.i. mit kleiner m.o.i. reproduzierbar keine infektiösen Viren mehr im Überstand nachweisbar waren (Abb. 32A). Möglicherweise entstehen noch gleich viele Viren wie für den Wildtyp, aber der Gesamtiter wird durch eine verminderte Virusstabilität reduziert. Das würde auch der MTT-Test stützen, bei dem die Menge vitaler Zellen nach Infektion mit den Mutanten über den beobachteten Zeitraum von 48 h zeitgleich mit der in Wildtypinfektionen abnimmt (vgl. Abb. 33). Es wäre daher sinnvoll in einem zukünftigen Experiment die Stabilität der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp, z.B. bei Rt, über einen Zeitraum von 96 h zu verfolgen.

Eine aktuelle Studie zeigte, dass Modifikationen im C-terminalen Bereich des M2-Proteins zu einer Reduktion der Virusstabilität führen³⁰⁴. Dieser Bereich ist an der Regulation der **Autophagie** beteiligt, einem konstitutiven Abbauweg in Zellen, der sich bei ungünstigen Bedingungen verstärkt³⁰⁵. In mit Influenzaviren infizierten Zellen bewirkt M2 über einen unbekannten Mechanismus die Akkumulation von Autophagosomen und lenkt diese durch die Interaktion mit dem LC3-Protein der Autophagosomenmembran zur Plasmamembran. Dies liefert möglicherweise Lipide für die Herstellung der Nachkommenviren³⁰⁴. Die Interaktion mit LC3 erfolgt über das LIR (*LC3 interacting-region*)-Motiv der M2-Aminosäuren 91-94. Die Mutation dieses Motivs führte in der Arbeit von Beale *et al.*³⁰⁴ zu Nachkommenviren mit einer reduzierten Stabilität, möglicherweise weil die Lipidzusammensetzung ihrer Hülle suboptimal ist. Dieses Motiv liegt hinter der AH, aber es ist nicht auszuschließen, dass weitere für die Virusstabilität kritische Aminosäuren im C-terminalen Bereich von M2, z.B. in der AH, existieren, die ebenfalls an der Regulation der Autophagie beteiligt sein könnten. So

fanden Gannagé *et al.*³⁰⁶, dass im Bereich der ersten 60 As von M2 die Bindestelle für das Autophagie Gerüstprotein Beclin-1 liegt, durch dessen Bindung M2 zu Beginn der Infektion die Autophagie zunächst fördert. Dass allerdings die Akkumulation von Autophagosomen in Zellen, die mit den M2-Helixmutanten infiziert sind, nicht beeinträchtigt ist, konnte gezeigt werden (B. Thaa, persönliche Mitteilung).

Da sich Defekte bei der Abschnürung von der Wirtszelle, der postulierten Aufgabe der M2-Helix⁸⁰, oft in der Virusmorphologie widerspiegeln und die gebildeten Viren dann beispielsweise filamentöser sind oder perlenkettenähnlich aussehen, wenn mehrere sphärische Partikel miteinander verbunden bleiben⁵⁴, sollten die hier hergestellten Mutanten auf jeden Fall per TEM analysiert werden.

4.4.3 Die Amphiphilität der cytoplasmatischen M2-Helix ist vermutlich wichtig

Die Bedeutung der Helix-Amphiphilität sollte auch mit einer M2-Variante mit reduzierter Helix-Amphiphilität (M2-Gescrambelt (WSN)) untersucht werden. Infektiöse, rekombinante WSN-Viren mit gescrambelter WSN-M2-Helixsequenz konnten, im Gegensatz zu solchen mit gescrambelter Udorn-M2-Helixsequenz, nicht hergestellt werden (Abb. 31B). Die Zusammensetzung der Helix beider Varianten unterscheidet sich nur in drei Aminosäuren, was vermuten lässt, dass die Ursache das stark reduzierte hydrophobe Moment der gescrambelten WSN-Helix ist (vgl. Tab. 15 und Abb. 29). Allerdings ist auch die lineare As-Sequenz verschieden, was nicht gänzlich als Grund ausgeschlossen werden kann. Für die Wichtigkeit der Amphiphilität spricht aber auch, dass alle anderen in dieser Arbeit erfolgreich hergestellten Viren eine amphiphile Helix besitzen und dass Viren, in denen die Helix durch das stark amphiphile RW16-Peptid ersetzt wurde, von allen Mutanten am besten wachsen. Im Einklang damit zeigten in vorherigen Untersuchungen M2-Varianten, in denen das hydrophobe Moment der Helix durch Substitution von zwei bis fünf hydrophoben Aminosäuren durch Alanin bis auf 0,229 (5-Ala-Mutante) reduziert wurde (vgl. Tab. 15), mitunter starke Wachstumsdefekte^{69,224}. Während die Protonenkanalaktivität dieser M2-Proteine vergleichbar mit der des Wildtyps war^{68,199,224}, waren diese M2-Varianten oder das Helixpeptid der 5-Ala-Mutante nicht mehr in der Lage *in vitro* eine Vesikelbildung in GUVs zu induzieren⁶⁹. Die TEM ergab, dass diese Viren eine perlenschnurähnliche Morphologie besitzen, was auf eine beeinträchtigte Abspaltung von der Wirtszelle hindeutet. Auch in der Arbeit von Schmidt *et al.*¹²⁶ war die Fähigkeit zur Induktion einer negativen Gauß-Krümmung für die 5-Ala-Mutante gegenüber dem Wildtyp stark reduziert. Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit der für die M2-

Helix postulierten Rolle bei der Virusabschnürung von der Wirtszelle und stützen die Bedeutung der Helix-Amphiphilität für diesen Prozess.

Allerdings fällt auf, dass Viren mit der **gescrambelten Udorn-Helix** deutlich schlechter wachsen, als der Wildtyp und als alle anderen Viren mit M2-Helixmodifikation (Abb. 32A), obwohl das hydrophobe Moment ähnlich dem des WSN-Wt ist (Tab. 15). Folglich scheint die Amphiphilität allein nicht für die effiziente Produktion neuer Viren auszureichen, sondern zusätzlich die Sequenz oder bestimmte Aminosäuren (möglicherweise für die Ausbildung der Helixstruktur, s. u.) von Wichtigkeit zu sein. Der Verlauf der Wachstumskurve von Viren mit gescrambelter Udorn-Helix ähnelt prinzipiell dem des Wildtyps und zeigt keine abrupte Titerreduktion, wie bei Viren mit M2-ALPS, -Epsin und -RW16. Daher handelt es sich vermutlich um kein Stabilitätsproblem. Möglicherweise werden weniger infektiöse Viren hergestellt, die für die Infektion weiterer Zellen zur Verfügung stehen, was in einer Mehrschritt-Wachstumskurve zu dem beobachteten flacheren Kurvenverlauf führen würde.

Sowohl die **Oberflächenexpression** dieser M2-Variante in transfizierten Zellen (nicht gezeigt), als auch der M2- und M1-Gehalt in Viruspartikeln (Abb. 34) waren vergleichbar mit Wildtypviren. Die ersten Ergebnisse der **TEM** von Viren mit gescrambelter Udorn-Helixsequenz deuten allerdings darauf hin, dass die filamentösen Viren dort länger sind, als beim Wildtyp und somit ein Defekt bei der Abspaltung vorliegen könnte. Passend dazu fanden Rossman *et al.*⁶⁹, dass ein Peptid dieser gescrambelten Udorn-M2-Helix nicht mehr in der Lage ist GUVs zu tubulieren. Möglicherweise ist die gescrambelte Udorn-Helixvariante entgegen der Vorhersage per Jpred²³⁰ *in vivo* doch nicht mehr in der Lage eine (stabile) Helixstruktur auszubilden oder es bildet nur noch ein Teil der Sequenz eine Helix aus, so dass M2 schlechter mit der Membran interagiert und die Abspaltung weniger effizient bewerkstelligt. Um diese Frage zu klären, wurden erste **Circular dichroismus (CD) Spektroskopie-Messungen** der Helixpeptide in CD-Puffer in Abwesenheit von Membranen durchgeführt. Interessanterweise ergaben die Messungen, dass Peptide des Wildtyps und der gescrambelten WSN-Sequenz unter diesen Bedingungen unstrukturiert vorliegen, die gescrambelte M2-Udorn-Variante hingegen eine größtenteils α -helikale Konformation aufweist (Abb. 38). Allerdings haben auch umgebende Proteinstrukturen einen Einfluss auf die Sekundärstruktur, so dass diese im Kontext des gesamten M2-Proteins eine andere sein könnte. Interessant wäre es, die CD-Messungen in Anwesenheit von Membranen, z.B. Liposomen (auch verschiedener Größe und somit Membrankrümmung), durchzuführen.

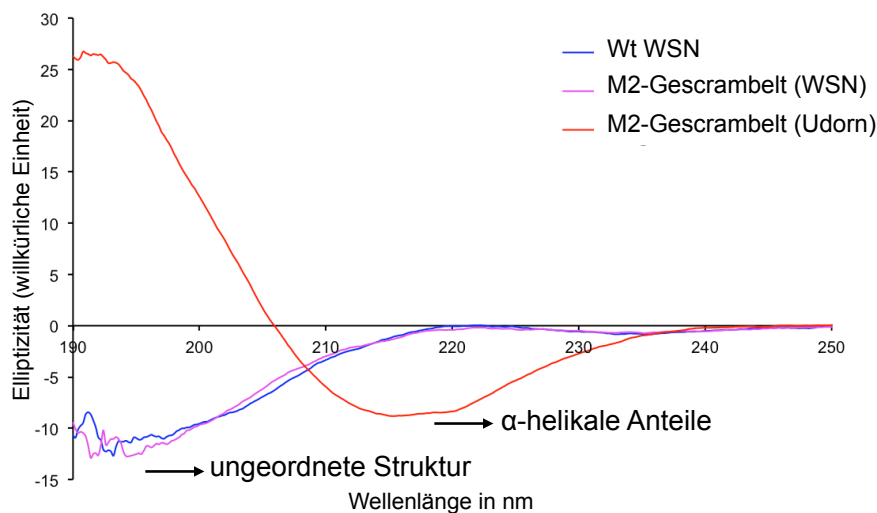


Abb. 38: CD-Spektren des M2-Wt-Helixpeptids und der Peptide mit gescrambelter Helixsequenz. Synthetische Peptide (60 μ M) wurden in CD-Puffer suspendiert und spektroskopisch analysiert. Die Spektren zeigen die Mittelwerte von 15 Scans. Die Zuordnung erfolgte durch den Vergleich mit Standardkurven von Proteinen mit definierter Sekundärstruktur³⁰⁷. Ein Minimum zwischen 208 und 220 nm ist charakteristisch für α -helikale Konformationen.

Die ersten Ergebnisse der CD-Messung suggerieren, dass die Wt-Helix erst bei Kontakt mit (geeignet gekrümmten) Membranen ausgebildet werden könnte, und Viren mit der gescrambelten Udorn-Variante schlechter wachsen, weil die Krümmungsdetektion nicht mehr effizient erfolgt. Möglicherweise interagiert die vorzeitig ausgebildete Helix unspezifisch mit Membranen jeglicher Krümmung, was zu einem Lokalisationsdefekt führt. Dazu passt auch, dass Viren mit der M2-ALPS-Variante, einem typischen Krümmungssensor, relativ gut wachsen (Abb. 32A). Ein Verlust der Fähigkeit eine bestimmte Membrankrümmung zu detektieren könnte in der M2-Epsin- und M2-RW16-Variante durch eine erhöhte Effizienz beim Abspalten von der Wirtszelle, bedingt durch das stärkere hydrophobe Moment ihrer Helix, kompensiert werden.

Liposomen-Binde-Experimente sollten zur Analyse der Bindung und Faltung von Peptiden der M2-Helix (und der M2-Helixvarianten), bzw. eines, den CP-Bereich umfassenden Peptids durchgeführt werden. Weiterhin könnte mittels GUVs die Fähigkeit der Peptide, Membranen zu deformieren, analysiert werden.

Neben der Membrankrümmung ist sehr wahrscheinlich aber auch die **Lipidzusammensetzung** der Membran von Bedeutung und außer Cholesterol (vgl. Kap. 1.4.2) spielen möglicherweise auch andere Lipide eine regulatorische Rolle bei der Knospung von Influenzaviren. So zeigen aktuelle Untersuchungen, dass M2 generell Krümmungen in Membranen verschiedenster Zusammensetzung generiert und lassen vermuten, dass die Membranzusammensetzung die Art (und möglicherweise auch das Ausmaß) der erzeugten Krümmung bestimmen könnte, da Lipidkomponenten die Tiefe der Helixinsertion, das Clustern der M2-Tetramere und die Orientierung der TMD und der AH beeinflussen können^{126,211,303}. Ein potenzieller

Kandidat für eine regulatorische Wirkung ist **PIP2**, welches angereichert im inneren Membranblatt vorliegt³⁰⁸ und dem Schlüsselrollen in vielen biologischen Prozessen zukommen³⁰⁹. Es ist eine Vorstufe wichtiger sekundärer Botenstoffe und Kofaktor vieler membranassoziierter Enzyme und einige Studien deuten darauf hin, dass PIP2 ein genereller Bestandteil von Rafts, und somit der Knospungszone ist^{308,310}. PIP2 besitzt eine negativ geladene Lipidkopfgruppe, die durch die positiven Ladungen des hydrophilen Teils der M2-AH (abhängig vom Virusstamm bis zu sieben basische Aminosäuren) erkannt werden könnte. Durch Bindung von M2 könnte PIP2 im Bereich der Knospungszone angereichert werden und durch seine große Kopfgruppe zur negativen Membrankrümmung beitragen. Um die Bedeutung bestimmter Lipide näher zu untersuchen, sollten CD-Messungen mit Liposomen verschiedener Lipidzusammensetzung durchgeführt werden.

Nicht zuletzt könnten auch **zelluläre Faktoren** bei der Virusfreisetzung von der Wirtszelle beteiligt sein. Eine Übersicht findet sich in Ref. 80. Das kleine GTP-bindende Protein **Rab11**, welches verschiedene Funktionen beim zellulären Membrantransport inne hat^{286,287}, ist ein potenzieller Kandidat, der eine Rolle bei der Assemblierung, Knospung und Abspaltung verschiedener Viren und Influenzaviren spielen könnte. Rab11 wirkt durch die spezifische Interaktion mit sogenannten Rab11 „*family-interacting*“ Proteinen (FIPs)³¹¹. Für das Respiratorische Synzytialvirus, welches wie Influenzaviren ESCRT-unabhängig von der Wirtszelle abgeschnürt wird, gibt es Hinweise, dass an diesem Schritt Rab11-FIP2 maßgeblich beteiligt ist³¹². Eine Fähigkeit von Rab11-FIP2, die Membrankrümmung direkt zu modifizieren, konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden, so dass der Mechanismus unklar bleibt. Bruce *et al.*³¹³ zeigten aber, dass nach Reduktion der Menge an Rab11-FIP3 die Assemblierung von Influenzaviren beeinträchtigt ist und nach Reduktion von Rab11 signifikant weniger infektiöse Viruspartikel gebildet werden, vermutlich weil die Abspaltung von der Wirtszelle gestört ist. Weiterhin zeigten Demirov *et al.*³¹⁴, dass auch die Reduktion des Rezeptors für aktiviertes C Kinase (**RACK)-1 Protein** (das bei vielen Signalprozessen als Gerüstprotein fungiert³¹⁵ und welches das Matrixprotein M1 bindet) die Abspaltung von Influenzaviren unterbindet. Die Autoren schlussfolgerten, dass M1 bei der Freisetzung von Influenza-A-Viren eine aktive Rolle zukommt, die in Verbindung mit einem RACK-1-vermittelten Weg steht. Rab11, Rab11-FIP3 und RACK-1 sind bei unterschiedlichen zellulären Abspaltungsreaktionen, insbesondere bei der Abspaltung während der Cytokinese beteiligt. Sie modifizieren dort aber keine Membrankrümmung, sondern vermitteln den Transport von Recycling-Endosomen zur Teilungsfurche^{316,317}. Kürzlich wurde gezeigt, dass Rab11 auch den Transport viraler Proteine und Nukleokapside im Zuge der Assemblierung von Influenza-, Hanta- und Paramyxoviren

viren zur Plasmamembran vermittelt^{65,318–321}. Dies führte Rossman und Lamb⁸⁰ zu der Annahme, dass Rab11, Rab11-FIP3 und RACK-1 die für die Assemblierung oder Abspaltung von Viren benötigten Komponenten (möglicherweise auch M2, vgl. Kap. 4.2.1) zur Knospungszone bringen könnten. Die Interaktion von Rab11 mit FIPs erfolgt über eine amphiphile Helix im C-Terminus der FIPs³¹¹. Da M2 ebenfalls eine C-terminale AH besitzt, wäre eine Möglichkeit, dass es über diese mit Rab11 interagiert.

Einige Viren benötigen indessen für die Knospung die Aktivität von **ATPasen**⁵⁶ und es gibt Hinweise, dass auch für die Knospung und/oder Abspaltung von Influenzaviren die plasmamembranassoziierte, in Raft-Mikrodomänen lokalisierte, zelluläre F1Fo-ATPase³²² eine Rolle spielt. So zeigten Gorai *et al.*³²³, dass die effiziente Produktion von Influenzaviruspartikeln die Aktivität der F1Fo-ATPase benötigt. Basierend auf der Tatsache, dass die Cristae der Mitochondrienmembran durch die Aktivität der dort lokalisierten ATPase gebildet werden, nahmen die Autoren an, dass eine Konzentration (und Selbstpolymerisation) der F1Fo-ATPase (bewirkt durch das Influenzavirusprotein NS2) an der Grenze von Membran-Rafts dort auch eine Membrankrümmung bewirken könnte, die zusammen mit M2 zur Abspaltung von der Wirtszelle führt.

4.5 Ausblick

Die Assemblierung und Knospung von Influenzaviren ist ein hoch komplexer Prozess, bei dem virale und zelluläre Bestandteile vielschichtig miteinander interagieren. Das Zusammenwirken verschiedener Mechanismen gewährleistet dabei eine Robustheit und Redundanz, die eine erfolgreiche Herstellung von Nachkommenviren sicherstellt. Weitere Forschung wird nötig sein, um die exakte Bedeutung der Acylierungen von HA und M2, sowie die Funktion der amphiphilen M2-Helix und den Mechanismus der M2-Lokalisation am Rand der Knospungszone abschließend aufzuklären. Die Kenntnis des genauen Ablaufs einer Influenzavirusinfektion schafft dann die Basis für die Entwicklung neuer wirksamer Medikamente.

Die vorliegende Arbeit zeigt einen möglichen Ansatzpunkt für die zukünftige Behandlung von Influenzavirusinfektionen auf: Die Acylierungen in HA und M2. Es wurde bestätigt, dass HAs Acylierungen sehr wichtig für die Virusreplikation sind, und darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein synergistischer Effekt mit der M2-Acylierung besteht (vgl. Tab. 37B). Acylierungen als Proteinmodifikationen sind auch von großer Bedeutung für die Replikation anderer humanpathogener Viren, wie z.B. HI- und Masernviren⁵². Eine Möglichkeit solche

viralen Infektionen zukünftig zu behandeln, könnte es daher sein, die Acylierung zu blockieren (Übersicht in Veit & Siche¹⁰⁷).

Die Enzyme, die HA, M2 und andere virale Proteine acylieren, wurden bisher noch nicht identifiziert. Man geht aber davon aus, dass sie Mitglieder der DHHC-Proteinfamilie (polytoxische Membranproteine mit einem Asp-His-His-Cys-Motiv in einer ihrer CP-Domänen) sind, zu der die Protein-Acyl-Transferasen vieler zellulärer Proteine gehören^{324,325}. Die meisten DHHC-Enzyme befinden sich in Membranen des ER und des Golgi-Apparates, dem Ort der Acylierung von HA und M2¹⁰⁶. Allein im Menschen gibt es etwa 23 DHHC-Proteine mit verschiedener, nur teilweise überlappender Substratspezifität^{326,327}. Nur wenige DHHC-Proteine könnten in den Atemwegszellen der Lunge, dem Ort der Influenzavirusreplikation²⁹, für die Acylierung von HA und M2 verantwortlich sein. Zudem würde es vermutlich genügen, die Palmitoylierung zu unterbinden, da dies, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, die für die Virusreplikation kritischere Acylierung ist, wohingegen das Fehlen der Stearoylierung nur geringe Effekte auf die Virusreplikation hat. Idealerweise würden HA und M2 durch dasselbe DHHC-Enzym acyliert, wodurch möglicherweise eine geringe Konzentration eines selektiven Inhibitors (und somit nur eine teilweise Blockade des Enzymes) bereits ausreichen könnte, um die Virusreplikation zu unterdrücken und gleichzeitig die Acylierung zellulärer Proteine nicht (oder nur wenig) zu behindern. Da die Acylierung vieler zellulärer Proteine einem schnellen Wandel unterliegt, würde eine temporäre Acylierungsblockade nach der Behandlung vermutlich binnen kurzer Zeit ausgeglichen werden.

Dass DHHC-Inhibitoren gegen zelluläre Komponenten gerichtet sind wäre ein großer Vorteil, da das Potenzial einer Resistenzbildung in Zellen vergleichsweise gering ist und sich Resistenzen zunehmend als Problem der derzeit gängigen Behandlung mit Inhibitoren für die Neuraminidase oder M2 erweisen^{328,329}.

Insgesamt sind DHHC-Proteine somit ein vielversprechendes Ziel zukünftiger antiviraler Medikamente und da sie vermutlich auch an der Entstehung von Krebs und neurologischen Störungen beteiligt sind, ist die Suche nach Inhibitoren für DHHC-Enzyme ein aktuell stark bearbeitetes Thema^{107,330}.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Webster, R., Bean, W., Gorman, O., Chambers, T. & Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* **56**, 152–179 (1992).
2. Jones, B. Spreading the word about seasonal influenza. *Bull. World Health Organ.* **90**, 252–253 (2012).
3. Yassine, H. M., Lee, C.-W., Gourapura, R. & Saif, Y. M. Interspecies and intraspecies transmission of influenza A viruses: viral, host and environmental factors. *Anim. Health Res. Rev.* **11**, 53–72 (2010).
4. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 15–22 (2006).
5. Fineberg, H. V. Pandemic preparedness and response-lessons from the H1N1 influenza of 2009. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1335–42 (2014).
6. Oh, D. Y. & Hurt, A. C. A Review of the Antiviral Susceptibility of Human and Avian Influenza Viruses over the Last Decade. *Scientifica (Cairo)*. **2014**, ArticleID:430629 (2014).
7. Webster, R. G. & Govorkova, E. A. Continuing challenges in influenza. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1323**, 115–139 (2014).
8. Palese, P. & Shaw, M. L. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*, 5th ed. D. Knipe & P. Howley, Eds.: 1647–1689. Philadelphia, P. L. W. & W. (2007).
9. Pica, N. & Palese, P. Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges. *Annu. Rev. Med.* **64**, 189–202 (2013).
10. Lamb, R. A. & Choppin, P. W. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 467–506 (1983).
11. Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26**, D49–D53 (2008).
12. Matsuoka, Y. *et al.* A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Syst. Biol.* **7**, 97 (2013).
13. Dubois, J. *et al.* Influenza Viruses and mRNA Splicing : Doing More with Less. *MBio* **5**, 1–13 (2014).
14. Gerber, M., Isel, C., Moules, V. & Marquet, R. Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends Microbiol.* **22**, 446–455 (2014).
15. Abbas, M. & Abidin, Z. U. Proteins of Influenza Virus: A Review. *J. Infect. Mol. Biol.* **1**, 1–7 (2013).
16. Medina, R. A. & García-Sastre, A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 590–603 (2011).
17. Tong, S. *et al.* New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog.* **9**,

- e1003657 (2013).
18. Robb, N. C., Smith, M., Vreede, F. T. & Fodor, E. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J. Gen. Virol.* **90**, 1398–1407 (2009).
 19. Richardson, J. C. & Akkina, R. K. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch. Virol.* **116**, 69–80 (1991).
 20. Hale, B. G., Randall, R. E., Ortin, J. & Jackson, D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **89**, 2359–2376 (2008).
 21. Jagger, B. W. *et al.* An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response. *Science* **337**, 199–204 (2012).
 22. Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R. & Kawaoka, Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J. Virol.* **87**, 2455–62 (2013).
 23. Wise, H. M. *et al.* A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J. Virol.* **83**, 8021–8031 (2009).
 24. Chen, W. *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* **7**, 1306–1312 (2001).
 25. Mazur, I. *et al.* The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell. Microbiol.* **10**, 1140–1152 (2008).
 26. Harris, A. *et al.* Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19123–19127 (2006).
 27. Ito, T. & Kawaoka, Y. Host-range barrier of influenza A viruses. *Vet. Microbiol.* **74**, 71–75 (2000).
 28. Ito, T. *et al.* Recognition of N-glycolylneuraminic acid linked to galactose by the alpha 2,3 linkage is associated with intestinal replication of influenza A virus in ducks. *J. Virol.* **74**, 9300–9305 (2000).
 29. Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. & Klenk, H.-D. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4620–4624 (2004).
 30. Neumann, G., Noda, T. & Kawaoka, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **459**, 931–939 (2009).
 31. Wilks, S., De Graaf, M., Smith, D. J. & Burke, D. F. A review of Influenza haemagglutinin receptor binding as it relates to pandemic properties. *Vaccine* **30**, 4369–4376 (2012).
 32. Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A. & Simons, K. Infectious Entry Pathway of Influenza-Virus in A Canine Kidney-Cell Line. *J. Cell Biol.* **91**, 601–613 (1981).
 33. Mercer, J., Schelhaas, M. & Helenius, A. Virus Entry by Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 803–833 (2010).
 34. Nunes-Correia, I., Eulálio, A., Nir, S. & Pedroso de Lima, M. C. Caveolae as an additional

- route for influenza virus endocytosis in MDCK cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **9**, 47–60 (2004).
35. Rossman, J. S., Leser, G. P. & Lamb, R. A. Filamentous Influenza Virus Enters Cells via Macropinocytosis. *J. Virol.* **86**, 10950–10960 (2012).
 36. Maxfield, F. R. & Y. D. J. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **225**, 189–198 (1987).
 37. Martin, K. & Helenius, A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J. Virol.* **65**, 232–244 (1991).
 38. Martin, K. & Helenius, A. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: The viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**, 117–130 (1991).
 39. Wu, W. W. H., Sun, Y.-H. B. & Panté, N. Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. *Virol. J.* **4**, 49 (2007).
 40. Eisfeld, A. J., Neumann, G. & Kawaoka, Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 28–41 (2014).
 41. Hutchinson, E. C. & Fodor, E. Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses* **5**, 2424–2446 (2013).
 42. Dias, A. *et al.* The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**, 914–918 (2009).
 43. Wolff, T., O'Neill, R. E. & Palese, P. NS1-Binding protein (NS1-BP): A novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J. Virol.* **72**, 7170–7180 (1998).
 44. Neumann, G., Castrucci, M. R. & Kawaoka, Y. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J. Virol.* **71**, 9690–9700 (1997).
 45. Jones, I. M., Reay, P. A. & Philpott, K. L. Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2. *EMBO J.* **5**, 2371–2376 (1986).
 46. Hutchinson, E. C., Orr, O. E., Liu, S. M., Engelhardt, O. G. & Fodor, E. Characterization of the interaction between the influenza A virus polymerase subunit PB1 and the host nuclear import factor ran-binding protein 5. *J. Gen. Virol.* **92**, 1859–1869 (2011).
 47. Neumann, G., Hughes, M. T. & Kawaoka, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.* **19**, 6751–6758 (2000).
 48. Bui, M., Wills, E. G., Helenius, A. & Whittaker, G. R. Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J. Virol.* **74**, 1781–1786 (2000).
 49. Portela, A. & Digard, P. The influenza virus nucleoprotein: A multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J. Gen. Virol.* **83**, 723–734 (2002).
 50. Momose, F., Kikuchi, Y., Komase, K. & Morikawa, Y. Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect.* **9**, 1422–1433 (2007).

51. Wagner, R., Matrosovich, M. & Klenk, H. D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* **12**, 159–166 (2002).
52. Veit, M. Palmitoylation of virus proteins. *Biol. Cell* **104**, 493–515 (2012).
53. Mora, R., Rodriguez-Boulan, E., Palese, P. & García-Sastre, A. Apical budding of a recombinant influenza A virus expressing a hemagglutinin protein with a basolateral localization signal. *J. Virol.* **76**, 3544–3553 (2002).
54. Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H. & Barman, S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res.* **143**, 147–161 (2009).
55. Rossman, J. S. & Lamb, R. A. Influenza virus assembly and budding. *Virology* **411**, 229–236 (2011).
56. Chen, B. J. & Lamb, R. A. Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT? *Virology* **372**, 221–232 (2008).
57. Leser, G. P. & Lamb, R. A. Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: A quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. *Virology* **342**, 215–227 (2005).
58. Veit, M. & Thaa, B. Association of influenza virus proteins with membrane rafts. *Adv. Virol.* **2011**, ArticleID:370606 (2011).
59. Takeda, M., Leser, G. P., Russell, C. J. & Lamb, R. A. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14610–14617 (2003).
60. Ali, A., Avalos, R. T., Ponimaskin, E. & Nayak, D. P. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J. Virol.* **74**, 8709–8719 (2000).
61. Jin, H., Leser, G. P., Zhang, J. & Lamb, R. A. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. *EMBO J.* **16**, 1236–1247 (1997).
62. Jin, H., Leser, G. P. & Lamb, R. A. The influenza virus hemagglutinin cytoplasmic tail is not essential for virus assembly or infectivity. *EMBO J.* **13**, 5504–5515 (1994).
63. Ye, Z., Liu, T., Offringa, D. P., McInnis, J. & Levandowski, R. A. Association of Influenza Virus Matrix Protein with Ribonucleoproteins. *J. Virol.* **73**, 7467–7473 (1999).
64. Nayak, D. P., Hui, E.-K. W., Barman, S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res.* **106**, 147–165 (2004).
65. Amorim, M. J. *et al.* A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *J. Virol.* **85**, 4143–4156 (2011).
66. Hughey, P. G., Compans, R. W., Zebedee, S. L. & Lamb, R. A. Expression of the influenza A virus M2 protein is restricted to apical surfaces of polarized epithelial cells. *J. Virol.* **66**, 5542–5552 (1992).
67. Chen, B. J., Leser, G. P., Jackson, D. & Lamb, R. A. The influenza virus M2 protein

- cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J. Virol.* **82**, 10059–10070 (2008).
68. Rossman, J. S. *et al.* Influenza virus M2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *J. Virol.* **84**, 5078–5088 (2010).
69. Rossman, J. S., Jing, X., Leser, G. P. & Lamb, R. A. Influenza Virus M2 Protein Mediates ESCRT-Independent Membrane Scission. *Cell* **142**, 902–913 (2010).
70. McCown, M. F. & Pekosz, A. The Influenza A Virus M 2 Cytoplasmic Tail Is Required for Infectious Virus Production and Efficient Genome Packaging. *J. Virol.* **79**, 3595–3605 (2005).
71. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–731 (1972).
72. van Meer, G., Voelker, D. R., Feigenson, G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
73. van Meer, G. & de Kroon, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* **124**, 5–8 (2011).
74. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46–50 (2010).
75. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
76. Owen, D. M., Magenau, A., Williamson, D. & Gaus, K. The lipid raft hypothesis revisited - new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy. *BioEssays* **34**, 739–747 (2012).
77. Feigenson, G. W. G. Phase boundaries and biological membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 63–77 (2007).
78. Veatch, S. L. & Keller, S. L. Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 3–6 (2005).
79. Simons, K. & Vaz, W. L. C. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 269–295 (2004).
80. Rossman, J. S. & Lamb, R. A. Viral membrane scission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **29**, 551–69 (2013).
81. Pike, L. J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* **47**, 1597–1598 (2006).
82. Simons, K. & Sampaio, J. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**:a004697 (2011).
83. Simons, K. & Gerl, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 688–699 (2010).
84. Jacobson, K., Mouritsen, O. G. & Anderson, R. G. W. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat. Cell Biol.* **9**, 7–14 (2007).

85. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39 (2000).
86. Brown, D. A. & London, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **275**, 17221–17224 (2000).
87. Takahashi, T. & Suzuki, T. Function of membrane rafts in viral lifecycles and host cellular response. *Biochem. Res. Int.* **2011**, ArticleID:245090 (2011).
88. Scheiffele, P., Rietveld, A., Simons, K. & Wilk, T. Influenza Viruses Select Ordered Lipid Membrane Domains during Budding from the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 2038–2044 (1999).
89. Levental, I., Grzybek, M. & Simons, K. Greasing their way: Lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry* **49**, 6305–6316 (2010).
90. Lingwood, D., Ries, J., Schwille, P. & Simons, K. Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10005–10010 (2008).
91. Munro, S. Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell* **115**, 377–388 (2003).
92. Brown, D. A. & Rose, J. K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533–544 (1992).
93. Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G. & Brown, D. A. Role of lipid modification in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **274**, 3910–3917 (1999).
94. Veit, M., Engel, S., Thaa, B., Scolari, S. & Herrmann, A. Lipid domain association of influenza virus proteins detected by dynamic fluorescence microscopy techniques. *Cell. Microbiol.* **15**, 179–189 (2013).
95. Gunewardene, M. S. *et al.* Superresolution imaging of multiple fluorescent proteins with highly overlapping emission spectra in living cells. *Biophys. J.* **101**, 1522–1528 (2011).
96. Kusumi, A. *et al.* Dynamic Organizing Principles of the Plasma Membrane that Regulate Signal Transduction: Commemorating the Fortieth Anniversary of Singer and Nicolson’s Fluid-Mosaic Model. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 215–250 (2012).
97. Kraft, M. L. Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2765–8 (2013).
98. Betzig, E. *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642–1645 (2006).
99. Sahl, S. J., Leutenegger, M., Hilbert, M., Hell, S. W. & Eggeling, C. Fast molecular tracking maps nanoscale dynamics of plasma membrane lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6829–6834 (2010).
100. Gustafsson, M. G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* **198**, 82–87 (2000).

101. Thaa, B. Assemblierung von Influenzaviren: Wechselwirkungen der Proteine M1 und M2 mit Membranen und Membrandomänen. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin. (2011).
102. Epand, R. M. Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 1576–1582 (2008).
103. de Vries, M., Herrmann, A. & Veit, M. A cholesterol consensus motif is required for efficient intracellular transport and raft association of a group 2 HA from influenza virus. *Biochem. J.* **465**, 305–314 (2015).
104. Veit, M., Serebryakova, M. V. & Kordyukova, L. V. Palmitoylation of influenza virus proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 50–55 (2013).
105. Levental, I., Lingwood, D., Grzybek, M., Coskun, U. & Simons, K. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 22050–22054 (2010).
106. Veit, M. & Schmidt, M. F. G. Timing of palmitoylation of influenza virus hemagglutinin. *FEBS Lett.* **336**, 243–247 (1993).
107. Veit, M., Siche, S. S-acylation of influenza virus proteins: Are enzymes for fatty acid attachment promising drug targets? *Vaccine* **33**, 7002–7007 (2015).
108. Kordyukova, L. V., Serebryakova, M. V., Baratova, L. A. & Veit, M. S acylation of the hemagglutinin of influenza viruses: mass spectrometry reveals site-specific attachment of stearic acid to a transmembrane cysteine. *J. Virol.* **82**, 9288–9292 (2008).
109. Brett, K. *et al.* Site Specific S-acylation of Influenza Virus Hemagglutinin: the Location of the Acylation Site Relative to the Membrane Border is the Decisive Factor for Attachment of Stearate. *J. Biol. Chem.* **289**, 34978–34989 (2014).
110. Bentz, J. & Mittal, A. Architecture of the influenza hemagglutinin membrane fusion site. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1614**, 24–35 (2003).
111. Kundu, A., Avalos, R. T., Sanderson, C. M. & Nayak, D. P. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Virol.* **70**, 6508–6515 (1996).
112. Barman, S. & Nayak, D. P. Analysis of the transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association. *J. Virol.* **74**, 6538–6545 (2000).
113. Lin, S., Naim, H. Y., Rodriguez, A. C. & Roth, M. G. Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J. Cell Biol.* **142**, 51–57 (1998).
114. Tall, R. D., Alonso, M. A. & Roth, M. G. Features of influenza HA required for apical sorting differ from those required for association with DRMS or MAL. *Traffic* **4**, 838–849 (2003).
115. Simons, K. & van Meer, G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197–6202 (1988).

116. Surma, M. A., Klose, C. & Simons, K. Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 1059–1067 (2012).
117. Ohkura, T., Momose, F., Ichikawa, R., Takeuchi, K. & Morikawa, Y. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase mutually accelerate their apical targeting through clustering of lipid rafts. *J. Virol.* **88**, 10039–10055 (2014).
118. Keller, P. & Simons, K. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* **140**, 1357–1367 (1998).
119. Traub, L. M. & Kornfeld, S. The trans-Golgi network: A late secretory sorting station. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 527–533 (1997).
120. Scheiffele, P., Roth, M. G. & Simons, K. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* **16**, 5501–5508 (1997).
121. Zhang, J., Pekosz, A. & Lamb, R. A. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: A role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J. Virol.* **74**, 4634–4644 (2000).
122. Engel, S., De Vries, M., Herrmann, A. & Veit, M. Mutation of a raft-targeting signal in the transmembrane region retards transport of influenza virus hemagglutinin through the Golgi. *FEBS Lett.* **586**, 277–282 (2012).
123. Polozov, I. V., Bezrukov, L., Gawrisch, K. & Zimmerberg, J. Progressive ordering with decreasing temperature of the phospholipids of influenza virus. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 248–255 (2008).
124. Harrison, S. C. Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 690–698 (2008).
125. Yao, H. & Hong, M. Conformation and lipid interaction of the fusion peptide of the paramyxovirus PIV5 in anionic and negative-curvature membranes from solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 2611–2624 (2014).
126. Schmidt, N. W., Mishra, A., Wang, J., Degrado, W. F. & Wong, G. C. L. Influenza virus A M2 protein generates negative gaussian membrane curvature necessary for budding and scission. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 13710–13719 (2013).
127. Zimmerberg, J. & Kozlov, M. M. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 9–19 (2006).
128. McMahon, H. T. & Gallop, J. L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**, 590–596 (2005).
129. Bacia, K., Schwille, P. & Kurzchalia, T. Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3272–3277 (2005).
130. Chen, Z. & Rand, R. P. The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and bending elasticity. *Biophys. J.* **73**, 267–276 (1997).
131. Schuck, S. & Simons, K. Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis

- of the apical membrane. *J. Cell Sci.* **117**, 5955–5964 (2004).
132. Klemm, R. W. *et al.* Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* **185**, 601–612 (2009).
133. Bischof, A. A. & Wilke, N. Molecular determinants for the line tension of coexisting liquid phases in monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **165**, 737–744 (2012).
134. Laradji, M. & Kumar, P. B. S. Domain growth, budding, and fission in phase-separating self-assembled fluid bilayers. *J. Chem. Phys.* **123**, 224902_1–11 (2005).
135. Lipowsky, R. Domain-induced budding of fluid membranes. *Biophys. J.* **64**, 1133–1138 (1993).
136. Minami, A. & Yamada, K. Domain-induced budding in buckling membranes. *Eur. Phys. J. E* **23**, 367–374 (2007).
137. Döbereiner, H. G., Käs, J., Noppl, D., Sprenger, I., Sackmann, E. Budding and fission of vesicles. *Biophys. J.* **65**, 1396–403 (1993).
138. Sackmann, E., Feder, T. Budding, fission and domain formation in mixed lipid vesicles induced by lateral phase separation and macromolecular condensation. *Mol. Membr. Biol.* **12**, 21–28 (1995).
139. Harrison, S. C. & Kirchhausen, T. Structural biology: Conservation in vesicle coats. *Nature* **466**, 1048–1049 (2010).
140. von Schwedler, U. K. *et al.* The protein network of HIV budding. *Cell* **114**, 701–713 (2003).
141. Shen, H., Pirruccello, M., De Carnilli, P. SnapShot: Membrane Curvature Sensors and Generators. *Cell*. **150**, 1300–1300.e1–2 (2012).
142. Drin, G. & Antonny, B. Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Lett.* **584**, 1840–1847 (2010).
143. Eisenberg, D., Weiss, R. M. & Terwilliger, T. C. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 140–144 (1984).
144. Drin, G. *et al.* A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 138–146 (2007).
145. Ford, M. G. J. *et al.* Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**, 361–366 (2002).
146. Bhatia, V. K. *et al.* Amphipathic motifs in BAR domains are essential for membrane curvature sensing. *EMBO J.* **28**, 3303–3314 (2009).
147. Antonny, B. Mechanisms of membrane curvature sensing. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 101–123 (2011).
148. Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S., Antonny, B. Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* **426**, 563–566 (2003).

149. Bigay, J, Casella, J. F., Drin, G., Mesmin, B., Antonny, B. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J.* **24**, 2244–2253 (2005).
150. Campelo, F. & Kozlov, M. M. Sensing Membrane Stresses by Protein Insertions. *PLoS Comput. Biol.* **10**, e1003556 (2014).
151. Kirchhausen, T. Bending membranes. *Nat. Cell Biol.* **14**, 906–908 (2012).
152. Dannhauser, P. N. & Ungewickell, E. J. Reconstitution of clathrin-coated bud and vesicle formation with minimal components. *Nat. Cell Biol.* **14**, 634–639 (2012).
153. Faelber, K. *et al.* Structural insights into dynamin-mediated membrane fission. *Structure* **20**, 1621–1628 (2012).
154. Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J. & Hurley, J. H. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* **458**, 172–177 (2009).
155. Alonso Y Adell, M. & Teis, D. Assembly and disassembly of the ESCRT-III membrane scission complex. *FEBS Lett.* **585**, 3191–3196 (2011).
156. Guizetti, J. & Gerlich, D. W. ESCRT-III polymers in membrane neck constriction. *Trends Cell Biol.* **22**, 133–140 (2012).
157. Hurley, J. H., Hanson, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: It's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 556–566 (2010).
158. Hurley, J. H., Boura, E., Carlson, L. A., Rozycki, B. Membrane budding. *Cell* **143**, 875–87 (2010).
159. Martin-Serrano, J. & Neil, S. J. D. Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 519–531 (2011).
160. Bruce, E. A., Medcalf, L., Crump, C. M., Noton, S. L., Stuart, A. D., *et al.* Budding of filamentous and non- filamentous influenza A virus occurs via a VPS4 and VPS28-independent pathway. *Virology* **390**, 268–78 (2009).
161. Watanabe, R., Lamb, R. A. Influenza virus budding does not require a functional AAA+ ATPase, VPS4. *Virus Res.* **151**, 58–63 (2010).
162. Chen, B. J., Leser, G. P., Morita, E. & Lamb, R. A. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J. Virol.* **81**, 7111–7123 (2007).
163. Fang, Y. *et al.* Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV Gag to exosomes. *PLoS Biol.* **5**, 1267–1283 (2007).
164. Gómez-Puertas, P., Albo, C., Pérez-Pastrana, E., Vivo, A. & Portela, A. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J. Virol.* **74**, 11538–11547 (2000).
165. Shnyrova, A. V. *et al.* Vesicle formation by self-assembly of membrane-bound matrix proteins into a fluidlike budding domain. *J. Cell Biol.* **179**, 627–633 (2007).
166. Lai, J. C. C. *et al.* Formation of virus-like particles from human cell lines exclusively

- expressing influenza neuraminidase. *J. Gen. Virol.* **91**, 2322–2330 (2010).
167. Wang, D. *et al.* The lack of an inherent membrane targeting signal is responsible for the failure of the matrix (M1) protein of influenza A virus to bud into virus-like particles. *J. Virol.* **84**, 4673–4681 (2010).
168. Lamb, R. A., Zebedee, S. L. & Richardson, C. D. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell* **40**, 627–633 (1985).
169. Stachowiak, J. C. *et al.* Membrane bending by protein–protein crowding. *Nat. Cell Biol.* **14**, 944–949 (2012).
170. Wilson, I. A., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* **289**, 366–373 (1981).
171. Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 531–69 (2000).
172. Carr, C. M., Chaudhry, C. & Kim, P. S. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14306–14313 (1997).
173. Horimoto, T. & Kawaoka, Y. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J. Virol.* **68**, 3120–3128 (1994).
174. Horimoto, T. & Kawaoka, Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 591–600 (2005).
175. Perdue, M. L. Molecular determinants of pathogenicity for avian influenza viruses. In *Avian Influenza*. D.E. Swayne, Ed.: 23–41. Ames, I. B. P. (2008).
176. Russell, R. J. *et al.* Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17736–17741 (2008).
177. Earp, L. J., Delos, S. E., Park, H. E. & White, J. M. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **285**, 25–66 (2005).
178. Huang, Q. *et al.* Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: Stability and energetics of the hemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1614**, 3–13 (2003).
179. Chernomordik, L. V. & Kozlov, M. M. Membrane hemifusion: Crossing a chasm in two leaps. *Cell* **123**, 375–382 (2005).
180. Nikolaus, J., Warner, J. M., O’Shaughnessy, B. & Herrmann, A. The pathway to membrane fusion through hemifusion. *Curr. Top. Membr.* **68**, 1–32 (2011).
181. Copeland, C. S. *et al.* Folding, trimerization, and transport are sequential events in the biogenesis of influenza virus hemagglutinin. *Cell* **53**, 197–209 (1988).
182. Veit, M. *et al.* Site-specific mutagenesis identifies three cysteine residues in the cytoplasmic tail as acylation sites of influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* **65**, 2491–2500 (1991).

183. Naeve, C. W. & Williams, D. Fatty acids on the A/Japan/305/57 influenza virus hemagglutinin have a role in membrane fusion. *EMBO J.* **9**, 3857–3866 (1990).
184. Engel, S. *et al.* FLIM-FRET and FRAP reveal association of influenza virus haemagglutinin with membrane rafts. *Biochem. J.* **425**, 567–573 (2010).
185. Hess, S. T. *et al.* Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17370–17375 (2007).
186. Wagner, R., Herwig, A., Azzouz, N., Klenk, H. D. & Irol, J. V. Acylation-Mediated Membrane Anchoring of Avian Influenza Virus Hemagglutinin is Essential for Fusion Pore Formation and Virus Infectivity. *J. Virol.* **79**, 6449–6458 (2005).
187. Chen, B. J., Takeda, M. & Lamb, R. A. Influenza virus hemagglutinin (H3 subtype) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly. *J. Virol.* **79**, 13673–84 (2005).
188. Melikyan, G. B., Jin, H., Lamb, R. A. & Cohen, F. S. The role of the cytoplasmic tail region of influenza virus hemagglutinin in formation and growth of fusion pores. *Virology* **235**, 118–128 (1997).
189. Sakai, T., Ohuchi, R. & Ohuchi, M. Fatty Acids on the A / USSR / 77 Influenza Virus Hemagglutinin Facilitate the Transition from Hemifusion to Fusion Pore Formation. *Society* **76**, 4603–4611 (2002).
190. Ujike, M. *et al.* Influence of Acylation Sites of Influenza B Virus Hemagglutinin on Fusion Pore Formation and Dilation. *J. Virol.* **78**, 11536–11543 (2004).
191. Naim, H. Y., Amarneh, B., Ktistakis, N. T. & Roth, M. G. Effects of altering palmitoylation sites on biosynthesis and function of the influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* **66**, 7585–7588 (1992).
192. Pinto, L. H., Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**, 517–528 (1992).
193. Pinto, L. H. & Lamb, R. A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* **281**, 8997–9000 (2006).
194. Lamb, R. A., Lai, C. J. & Choppin, P. W. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 4170–4174 (1981).
195. Wise, H. M. *et al.* Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain. *PLoS Pathog.* **8**, e1002998 (2012).
196. Zhou, H. X. & Cross, T. A. Modeling the membrane environment has implications for membrane protein structure and function: Influenza A M2 protein. *Protein Sci.* **22**, 381–394 (2013).
197. Wang, C., Lamb, R. A. & Pinto, L. H. Activation of the M2 ion channel of influenza virus: a role for the transmembrane domain histidine residue. *Biophys. J.* **69**, 1363–1371 (1995).

198. Tobler, K., Kelly, M. L., Pinto, L. H. & Lamb, R. A. Effect of cytoplasmic tail truncations on the activity of the M2 ion channel of influenza A virus. *J. Virol.* **73**, 9695–9701 (1999).
199. Ma, C. *et al.* Identification of the functional core of the influenza A virus A/M2 proton-selective ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12283–12288 (2009).
200. Sharma, M., Yi, M., Dong, H., Qin, H., Peterson, E., Busath, D. D., Zhou, H. X., Cross, T. A. Insight into the mechanism of the influenza A proton channel from a structure in a lipid bilayer. *Science* **330**, 509–512 (2010).
201. Liao, S. Y., Yang, Y., Tietze, D. & Hong, M. The Influenza M2 Cytoplasmic Tail Changes the Proton-Exchange Equilibria and the Backbone Conformation of the Transmembrane Histidine Residue to Facilitate Proton Conduction. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 6067–6077 (2015).
202. Cady, S. D., Mishanina, T. V., Hong, M. Structure of amantadine-bound M2 transmembrane peptide of influenza A in lipid bilayers from magic-angle-spinning solid-state NMR: the role of Ser31 in amantadine binding. *J. Mol. Biol.* **385**, 1127–1141 (2009).
203. Pielak, R. M., Chou, J. J. Solution NMR structure of the V27A drug resistant mutant of influenza A M2 channel. *Biochem Biophys Res Commun.* **401**, 58–63 (2010).
204. Acharya, R. *et al.* Structure and mechanism of proton transport through the transmembrane tetrameric M2 protein bundle of the influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15075–15080 (2010).
205. Stouffer, A. L. *et al.* Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature* **451**, 596–599 (2008).
206. Cady, S. D., Schmidt-Rohr, K., Wang, J., Soto, C. S., Degrado, W. F., Hong, M. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature* **463**, 689–692 (2010).
207. Schnell, J. R., Chou, J. J. Structure and Mechanism of the M2 Proton Channel of Influenza A Virus. *Nature* **451**, 591–595 (2008).
208. Claridge, J. K., Aittoniemi, J., Cooper, D. M. & Schnell, J. R. Isotropic bicelles stabilize the juxtamembrane region of the influenza M2 protein for solution NMR studies. *Biochemistry* **52**, 8420–8429 (2013).
209. Kochendoerfer, G. G. *et al.* Total chemical synthesis of the integral membrane protein influenza A virus M2: Role of its C-terminal domain in tetramer assembly. *Biochemistry* **38**, 11905–11913 (1999).
210. Huang, S. *et al.* C-terminal juxtamembrane region of full-length M2 protein forms a membrane surface associated amphipathic helix. *Protein Sci.* **24**, 426–429 (2015).
211. Liao, S. Y., Fritzsche, K. J. & Hong, M. Conformational analysis of the full-length M2 protein of the influenza A virus using solid-state NMR. *Protein Sci.* **22**, 1623–38 (2013).
212. Grantham, M. L., Stewart, S. M., Lalime, E. N. & Pekosz, A. Tyrosines in the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail are critical for production of infectious virus particles. *J. Virol.* **84**, 8765–8776 (2010).

213. Sugrue, R. J., Belshe, R. B. & Hay, A. J. Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein. *Virology* **179**, 51–56 (1990).
214. Veit, M., Klenk, H. D., Kendal, A. & Rott, R. The M2 protein of influenza A virus is acetylated. *J. Gen. Virol.* **72**, 1461–1465 (1991).
215. Schroeder, C., Heider, H., Möncke-Buchner, E. & Lin, T. I. The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur. Biophys. J.* **34**, 52–66 (2005).
216. Thaa, B. *et al.* Growth of influenza A virus is not impeded by simultaneous removal of the cholesterol-binding and acylation sites in the M2 protein. *J. Gen. Virol.* **93**, 282–92 (2012).
217. Thaa, B., Herrmann, A. & Veit, M. Intrinsic cytoskeleton-dependent clustering of influenza virus M2 protein with hemagglutinin assessed by FLIM-FRET. *J. Virol.* **84**, 12445–12449 (2010).
218. Thaa, B., Levental, I., Herrmann, A. & Veit, M. Intrinsic membrane association of the cytoplasmic tail of influenza virus M2 protein and lateral membrane sorting regulated by cholesterol binding and palmitoylation. *Biochem. J.* **437**, 389–397 (2011).
219. Zebedee, S. L. & Lamb, R. A. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J. Virol.* **62**, 2762–2772 (1988).
220. Stewart, S. M., Wu, W.-H., Lalime, E. N. & Pekosz, A. The cholesterol recognition/interaction amino acid consensus motif of the influenza A virus M2 protein is not required for virus replication but contributes to virulence. *Virology* **405**, 530–538 (2010).
221. Castrucci, M. R. *et al.* The cysteine residues of the M2 protein are not required for influenza A virus replication. *Virology* **238**, 128–134 (1997).
222. Grantham, M. L. *et al.* Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein is not required for virus replication in vitro but contributes to virus virulence. *J. Virol.* **83**, 8655–8661 (2009).
223. Martyna, A. & Rossman, J. S. Alterations of membrane curvature during influenza virus budding. *Biochem Soc Trans.* **42**, 1425–8 (2014).
224. Roberts, K. L., Leser, G. P., Ma, C. & Lamb, R. A. The amphipathic helix of influenza A virus M2 protein is required for filamentous bud formation and scission of filamentous and spherical particles. *J. Virol.* **87**, 9973–82 (2013).
225. Stewart, S. M. & Pekosz, A. Mutations in the Membrane-Proximal Region of the Influenza A Virus M2 Protein Cytoplasmic Tail Have Modest Effects on Virus Replication. *J. Virol.* **85**, 12179–12187 (2011).
226. Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G. & Webster, R. G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6108–6113 (2000).
227. Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C. & Tsien, R. Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913–916 (2002).
228. Vey, M., Orlich, M., Adler, S., Klenk, H. D., Rott, R. & Garten, W. Hemagglutinin activation

- of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* **188**, 408–413 (1992).
229. Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B. & Drin, G. HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics* **24**, 2101–2102 (2008).
230. Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J. & Barton, G. J. JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* **43**, 389–394 (2015).
231. Vincze, T., Posfai, J. & Roberts, R. J. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3688–3691 (2003).
232. Katoh, K. & Toh, H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief. Bioinform.* **9**, 286–298 (2008).
233. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Res.* **32**, 1792–1797 (2004).
234. Crooks, G., Hon, G., Chandonia, J. & Brenner, S. WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res* **14**, 1188–1190 (2004).
235. Schneider, T. D. & Stephens, R. M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6097–6100 (1990).
236. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U. (1989).
237. Birnboim, H. C. & Doley, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523 (1979).
238. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzym.* **155**, 335–350 (1987).
239. Ochman, H., Gerber, A. S. & Hartl, D. L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**, 621–623 (1988).
240. Urban, A., Neukirchen, S. & Jaeger, K. E. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2227–2228 (1997).
241. Pawley, J. Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3. Auflage, Springer, B. (2006).
242. Thaa, B., Herrmann, A. & Veit, M. The polybasic region is not essential for membrane binding of the matrix protein M1 of influenza virus. *Virology* **383**, 150–155 (2009).
243. Clegg, R. M. Förster resonance energy transfer—FRET: What is it, why do it, and how it's done. In 'Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology' (Hrsg. TWJ Gadella), 1–57. Elsevier, Amsterdam, N. (2009).
244. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3. Auflage, Springer, B. (2006).
245. Scolari, S. *et al.* Lateral distribution of the transmembrane domain of influenza virus hemagglutinin revealed by time-resolved fluorescence imaging. *J. Biol. Chem.* **284**, 15708–15716 (2009).

246. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
247. Wilson, C. M. Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Meth. Enzym.* **91**, 236–247 (1983).
248. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354 (1979).
249. Veit, M., Ponimaskin, E., Schmidt, M. F. G. Analysis of S-acylation of proteins. *Methods Mol. Biol.* **446**, 163–183 (2008).
250. Alder, A. J., Greenfield, N. J., Fasman, G. D. Circular dichroism and optical rotary dispersion of proteins and polypeptides. *Meth. Enzym.* **27**, 675 (1973).
251. Johnson, W. C. J. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* **7**, 205–214 (1990).
252. Krabben, L. *et al.* Synapsin I Senses Membrane Curvature by an Amphipathic Lipid Packing Sensor Motif. *J. Neurosci.* **31**, 18149–18154 (2011).
253. Mineev, K. S. *et al.* Structural investigation of influenza virus hemagglutinin membrane-anchoring peptide. *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 547–552 (2013).
254. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
255. Spackman, E. & Suarez, D. L. Type A influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. *Methods Mol Biol.* **436**, 19–26 (2008).
256. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
257. Thaa, B., Siche, S., Herrmann, A. & Veit, M. Acylation and cholesterol binding are not required for targeting of influenza A virus M2 protein to the hemagglutinin-defined budzone. *FEBS Lett.* **588**, 1031–1036 (2014).
258. Schmitt, F. J. *et al.* eGFP-pHsens as a highly sensitive fluorophore for cellular pH determination by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**, 1581–1593 (2014).
259. Rodriguez-Boulán, E. & Nelson, W. J. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* **245**, 718–725 (1989).
260. Chen, Y. T., Stewart, D. B. & Nelson, W. J. Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* **144**, 687–699 (1999).
261. Kenworthy, A. K., Petranova, N. & Edidin, M. High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1645–1655 (2000).

-
262. Siche, S., Brett, K., Möller, L., Kordyukova, L. V., Mintaev, R. R., Alexeevski, A. V., Veit, M. Two Cytoplasmic Acylation Sites and an Adjacent Hydrophobic Residue, but No Other Conserved Amino Acids in the Cytoplasmic Tail of HA from Influenza A Virus Are Crucial for Virus Replication. *Viruses* **7**, 6458–6475 (2015).
263. Zurcher, T., Luo, G. & Palese, P. Mutations at palmitoylation sites of the influenza virus hemagglutinin affect virus formation. *J. Virol.* **68**, 5748–5754 (1994).
264. Hutchinson, E. C. *et al.* Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat. Commun.* **5**, 4816 (2014).
265. Schulze, I. T. The structure of influenza virus. I. The polypeptides of the virion. *Virology* **42**, 890–904 (1970).
266. Watanabe, T., Watanabe, S., Ito, H. & Kida, H. Influenza A Virus Can Undergo Multiple Cycles of Replication without M2 Ion Channel Activity. *Society* **75**, 5656–5662 (2001).
267. Wang, T., Cady, S. D. & Hong, M. NMR determination of protein partitioning into membrane domains with different curvatures and application to the influenza M2 peptide. *Biophys. J.* **102**, 787–794 (2012).
268. Derossi, D., Chassaing, G. & Prochiantz, a. Trojan peptides: the penetrating system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* **8**, 84–88 (1998).
269. Jobin, M. L. *et al.* The enhanced membrane interaction and perturbation of a cell penetrating peptide in the presence of anionic lipids: Toward an understanding of its selectivity for cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 1457–1470 (2013).
270. Lamazière, A. *et al.* Non-metabolic membrane tubulation and permeability induced by bioactive peptides. *PLoS One* **2**, e201 (2007).
271. Engel, S. V. Assembly von Influenzaviren : Analyse von Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen mittels biochemischer und biophysikalischer Methoden. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin. (2008).
272. Schliwa, M. Action of Cytochalasin D on Cytoskeletal Networks. *J. Cell Biol.* **92**, 79–91 (1982).
273. Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C. & Tsien, R. Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913–916 (2002).
274. Brett, K. Molecular requirements of influenza virus hemagglutinin for site-specific S-acylation and virus replication. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin. (2015).
275. Imai, M., Watanabe, S. & Kawaoka, Y. The Cytoplasmic Tail Domain of Influenza B Virus Hemagglutinin Is Important for Its Incorporation into Virions but Is Not Essential for Virus Replication in Cell Culture in the Presence of Compensatory Mutations. *J. Virol.* **86**, 11633–11644 (2012).
276. Wang, M. & Veit, M. Hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) protein of influenza C virus. *Protein Cell* doi:10.1007/s13238-015-0193-x (2015).

- 277. Muraki, Y. *et al.* Palmitoylation of CM2 is dispensable to influenza C virus replication. *Virus Res.* **157**, 99–105 (2011).
- 278. Ruigrok, R. W. H. *et al.* Membrane Interaction of Influenza Virus M1 Protein. *Virology* **267**, 289–298 (2000).
- 279. Bucher, D. J. *et al.* Incorporation of influenza virus M-protein into liposomes. *J. Virol.* **36**, 586–90 (1980).
- 280. Gregoriades, A. & Frangione, B. Insertion of influenza M protein into the viral lipid bilayer and localization of site of insertion. *J Virol* **40**, 323–328 (1981).
- 281. Thorp, E. B., Boscarino, J. A., Logan, H. L., Goletz, J. T. & Gallagher, T. M. Palmitoylations on murine coronavirus spike proteins are essential for virion assembly and infectivity. *J Virol* **80**, 1280–1289 (2006).
- 282. Ujike, M. *et al.* Two palmitylated cysteine residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike (S) protein are critical for S incorporation into virus-like particles, but not for M-S co-localization. *J. Gen. Virol.* **93**, 823–8 (2012).
- 283. Bhattacharya, J., Peters, P. J. & Clapham, P. R. Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins that lack cytoplasmic domain cysteines: impact on association with membrane lipid rafts and incorporation onto budding virus particles. *J. Virol.* **78**, 5500–6 (2004).
- 284. McBride, C. E. & Machamer, C. E. Palmitoylation of SARS-CoV S protein is necessary for partitioning into detergent-resistant membranes and cell-cell fusion but not interaction with M protein. *Virology* **405**, 139–48 (2010).
- 285. Whitt, M. A. & Rose, J. K. Fatty Acid Acylation Is Not Required for Membrane Fusion Activity or Glycoprotein Assembly into VSV Virions. *Virology* **185**, 875–878 (1991).
- 286. Prekeris, R. Rabs, Rips, FIPs, and Endocytic Membrane Traffic. *Sci. World J.* **3**, 870–880 (2003).
- 287. Welz, T., Wellbourne-Wood, J. & Kerkhoff, E. Orchestration of cell surface proteins by Rab11. *Trends Cell Biol.* **24**, 407–414 (2014).
- 288. Iwatsuki-Horimoto, K. *et al.* The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J. Virol.* **80**, 5233–5240 (2006).
- 289. McCown, M. F. & Pekosz, A. Distinct domains of the influenza a virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J. Virol.* **80**, 8178–8189 (2006).
- 290. Viola, A. & Gupta, N. Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 889–896 (2007).
- 291. Chichili, G. R. & Rodgers, W. Cytoskeleton–membrane interactions in membrane raft structure. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2319–2328 (2009).
- 292. Simpson-Holley, M. *et al.* A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts

- during budding of filamentous influenza virions. *Virology* **301**, 212–225 (2002).
293. Gudheti, M. V. *et al.* Actin mediates the nanoscale membrane organization of the clustered membrane protein influenza hemagglutinin. *Biophys. J.* **104**, 2182–2192 (2013).
294. Ma, H. *et al.* Human Annexin A6 Interacts with Influenza A Virus Protein M2 and Negatively Modulates Infection. *J. Virol.* **86**, 1789–1801 (2012).
295. Mahmood, T., Ping-Chang, Y. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **4**, 429–434 (2012).
296. Holsinger, L. J., Shaughnessy, M. A., Micko, A., Pinto, L. H. & Lamb, R. A. Analysis of the posttranslational modifications of the influenza virus M2 protein. *J. Virol.* **69**, 1219–25 (1995).
297. Charollais, J. & Van Der Goot, F. G. Palmitoylation of membrane proteins (Review). *Mol. Membr. Biol.* **26**, 55–66 (2009).
298. Park, E. K., Castrucci, M. R., Portner, A. & Kawaoka, Y. The M2 ectodomain is important for its incorporation into influenza A virions. *J. Virol.* **72**, 2449–2455 (1998).
299. Jackson, D. & Lamb, R. A. The influenza A virus spliced messenger RNA M mRNA3 is not required for viral replication in tissue culture. *J. Gen. Virol.* **89**, 3097–3101 (2008).
300. Neumann, G. *et al.* Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9345–9350 (1999).
301. Watanabe, S., Watanabe, T. & Kawaoka, Y. Influenza A virus lacking M2 protein as a live attenuated vaccine. *J. Virol.* **83**, 5947–5950 (2009).
302. Ozawa, M. *et al.* Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *J. Virol.* **83**, 3384–3388 (2009).
303. Wang, T. & Hong, M. Investigation of the Curvature Induction and Membrane Localization of the Influenza Virus M2 Protein Using Static and Off-Magic-Angle Spinning Solid-State Nuclear Magnetic Resonance of Oriented Bicelles. *Biochemistry* **54**, 2214–2226 (2015).
304. Beale, R. *et al.* A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host Microbe* **15**, 239–247 (2014).
305. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
306. Gannagé, M. *et al.* Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* **6**, 367–380 (2009).
307. Greenfield, N., Fasman, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **10**, 4108–16 (1969).
308. Johnson, C. M. & Rodgers, W. Spatial Segregation of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP2) Signaling in Immune Cell Functions. *Immunol. Endocr. Metab. Agents - Med. Chem.* **8**, 349–357 (2008).
309. Shewan, A., Eastburn, D. J. & Mostov, K. Phosphoinositides in cell architecture. *Cold Spring*

Harb. Perspect. Biol. **3**, 1–17 (2011).

- 310. Wang, J. & Richards, D. A. Segregation of PIP2 and PIP3 into distinct nanoscale regions within the plasma membrane. *Biol. Open* **1**, 857–862 (2012).
- 311. Prekeris, R., Davies, J. M. & Scheller, R. H. Identification of a Novel Rab11/25 Binding Domain Present in Eferin and Rip Proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 38966–38970 (2001).
- 312. Utley, T. J. *et al.* Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10209–10214 (2008).
- 313. Bruce, E. A., Digard, P. & Stuart, A. D. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. *J. Virol.* **84**, 5848–5859 (2010).
- 314. Demirov, D., Gabriel, G., Schneider, C., Hohenberg, H. & Ludwig, S. Interaction of influenza A virus matrix protein with RACK1 is required for virus release. *Cell. Microbiol.* **14**, 774–789 (2012).
- 315. McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G. B., Houslay, M. D. & Yarwood, S. J. The RACK1 Scaffold Protein: A Dynamic Cog in Cell Response Mechanisms. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1261–1273 (2002).
- 316. Ai, E. & Skop, A. R. Endosomal recycling regulation during cytokinesis. *Commun. Integr. Biol.* **2**, 444–447 (2009).
- 317. Simon, G. C. & Prekeris, R. The role of FIP3-dependent endosome transport during cytokinesis. *Commun. Integr. Biol.* **1**, 132–133 (2008).
- 318. Chambers, R. & Takimoto, T. Trafficking of Sendai virus nucleocapsids is mediated by intracellular vesicles. *PLoS One* **5**, e10994 (2010).
- 319. Eisfeld, A. J., Kawakami, E., Watanabe, T., Neumann, G. & Kawaoka, Y. RAB11A is essential for transport of the influenza virus genome to the plasma membrane. *J. Virol.* **85**, 6117–6126 (2011).
- 320. Momose, F. *et al.* Apical Transport of Influenza A Virus Ribonucleoprotein Requires Rab11-positive Recycling Endosome. *PLoS One* **6**, e21123 (2011).
- 321. Rowe, R. K., Suszko, J. W. & Pekosz, A. Roles for the Recycling Endosome, Rab8, and Rab11 in hantavirus release from epithelial cells. *Virology* **382**, 239–249 (2008).
- 322. Champagne, E., Martinez, L. O., Collet, X. & Barbaras, R. Ecto-F1Fo ATP synthase/F1 ATPase: metabolic and immunological functions. *Curr. Opin. Lipidol.* **17**, 279–84 (2006).
- 323. Gorai, T. *et al.* F1Fo-ATPase, F-type proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 4615–4620 (2012).
- 324. Lobo, S., Greentree, W. K., Linder, M. E. & Deschenes, R. J. Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 41268–73 (2002).
- 325. Roth, A. F., Feng, Y., Chen, L. & Davis, N. G. The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *J. Cell Biol.* **159**, 23–8 (2002).

-
326. Greaves, J. & Chamberlain, L. H. DHHC palmitoyl transferases: Substrate interactions and (patho)physiology. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 245–253 (2011).
 327. Linder, M. E. & Jennings, B. C. Mechanism and function of DHHC S-acyltransferases: Figure 1. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 29–34 (2013).
 328. Thorlund, K., Awad, T., Boivin, G. & Thabane, L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect. Dis.* **11**, 134 (2011).
 329. Deyde, V. M. *et al.* Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J. Infect. Dis.* **196**, 249–257 (2007).
 330. Chavda, B., Arnott, J. A., Planey, S. L. Targeting protein palmitoylation: selective inhibitors and implications in disease. *Expert Opin Drug Discov* **9**, 1005–19 (2014).

VERÖFFENTLICHUNGEN

Artikel und Manuskripte:

Siche, S., Brett, K., Möller, L., Kordyukova, L.V., Mintaev, R.R., Alexeevski, A.V. & Veit, M. Two cytoplasmic acylation sites and an adjacent hydrophobic residue, but no other conserved amino acids in the cytoplasmic tail of HA from influenza A virus are crucial for virus replication. *Viruses* **7**, 6458–6475 (2015).

Veit, M. & **Siche, S.** S-acylation of influenza virus proteins: Are enzymes for fatty acid attachment promising drug targets? *Vaccine* **33**, 7002-7007 (2015).

Siche, S.*, Thaa, B.*, Herrmann, A. & Veit, M. Acylation and cholesterol binding are not required for targeting of influenza A virus M2 protein to the hemagglutinin-defined budozone. *FEBS Letters* **588**, 1031-1036 (2014).

* Beide Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen.

Siche, S., Neubauer, O., Hebbeln, P. & Eitinger, T. A bipartite S unit of an ECF-type cobalt transporter. *Research in Microbiology* **161**, 824-829 (2010).

Poster:

Siche, S., Thaa, B., Möller, L., Herrmann, A. & Veit, M. Acylation of influenza A virus M2 and HA might work synergistically for efficient budding of virus particles. *3rd international Influenza Meeting*, Münster (2012).

Siche, S., Thaa, B., Herrmann, A. & Veit, M. M2 of Influenza Virus and the role of ist amphipathic helix for budding. *64. Mosbacher Kolloquium – „Membranes in motion“*, Mosbach (2013).

Siche, S., Thaa, B., Herrmann, A. & Veit, M. Acylation of Influenza virus proteins HA and M2 and their role in budozone formation. *2nd international Symposium „Membranes and Modules“ (SFB)*, Berlin (2014).

Siche, S., Herrmann, A., McInerney, G.M., Veit, M. & Thaa, B. The amphipathic helix of influenza A virus M2: Possibly relevant for virion stability, but not necessary for autophagy. *25. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie e.V. (GfV)*, Bochum (2015).

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, sind nach bestem Wissen und Gewissen durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht worden.

Ich besitze keinen entsprechenden Doktorgrad und habe mich anderwärts nicht um einen solchen beworben.

Die dem Promotionsverfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den

Stefanie Siche